



Etude de la polarisation et de la division asymétrique de l'ovocyte de souris

Benoit Dehapiot

► To cite this version:

Benoit Dehapiot. Etude de la polarisation et de la division asymétrique de l'ovocyte de souris. Génétique animale. Université de Rennes, 2014. Français. NNT : 2014REN1S159 . tel-01171393

HAL Id: tel-01171393

<https://theses.hal.science/tel-01171393>

Submitted on 3 Jul 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : (Biologie)

Ecole doctorale (VAS)

Présenté par

Dehapiot Benoît

Préparée à l'unité de recherche UMR6290 IGDR
Institut de Génétique et Développement de Rennes
Université de Rennes 1

**Etude de la
polarisation et de la
division asymétrique
de l'ovocyte de
souris**

**Thèse soutenue à Rennes
le 27 Mai 2014**

devant le jury composé de :

Marie Hélène VERLHAC

Directeur de Recherche au CNRS / *rapporteur*

Alex McDOUGALL

Directeur de Recherche au CNRS / *rapporteur*

Robert ARKOWITZ

Directeur de Recherche au CNRS / *examineur*

Roland LE BORGNE

Directeur de Recherche au CNRS / *examineur*

Jacek KUBIAK

Directeur de Recherche au CNRS / *examineur*

Guillaume HALET

Chargé de Recherche au CNRS / *directeur de thèse*

TABLES DES MATIERES

ABREVIATIONS	3
PROLOGUE	4
INTRODUCTION	6
A. Croissance et maturation ovocytaire	7
1. Folliculogenèse	7
a) Formation des follicules primordiaux	7
b) Croissance folliculaire basale	8
c) Croissance folliculaire terminale et ovulation	9
2. Maturation et divisions asymétriques de l'ovocyte	10
a) Régulation du cycle méiotique en prophase I	11
b) Rupture de la vésicule germinale (GVBD)	13
c) Formation du fuseau méiotique	14
d) Positionnement asymétrique du fuseau	17
e) Polarisation du cortex ovocytaire	19
B. Les réseaux d'acto-myosine	22
1. Assemblage et organisation des filaments d'actine	22
a) Facteurs de nucléation	23
b) Organisation des réseaux d'actine	24
c) Cortex cellulaire et filaments d'actine	26
2. Contraction des réseaux d'actine par la myosine	27
a) Structure de la myosine 2	27
b) Régulation de l'activité contractile de la myosine 2	28
3. Régulation de l'acto-myosine par les Rho GTPases	29
a) Effecteurs des Rho GTPases	30
b) Rho GTPases et division cellulaire	31
C. Modèles de division asymétrique	34
1. Mécanismes généraux	34

2. Prolifération de la levure <i>S.cerevisiae</i>	35
a) Polarisation cellulaire.....	35
b) Positionnement du fuseau.....	36
3. Division du neuroblaste de <i>D.melanogaster</i>	38
a) Polarisation cellulaire.....	38
b) Positionnement du fuseau.....	40
4. Division du zygote <i>C.elegans</i>	41
a) Polarisation cellulaire.....	41
b) Positionnement du fuseau.....	43
OBJECTIFS DE THESE	45
RESULTATS	46
A. Signalisation par les GTPases Ran et Cdc42 au cours de la polarisation et des divisions asymétriques de l'ovocyte de souris	47
1. Problématique	47
2. Résultats.....	48
a) Rôle de Cdc42GTP lors des divisions asymétriques de l'ovocyte	48
b) Influence des Rho GTPases sur la polarisation des ERMs	49
B. Rôles et régulation de l'acto-myosine corticale lors de la deuxième division méiotique de l'ovocyte de souris	70
1. Problématique	70
2. Résultats.....	71
DISCUSSION	78
A. Cdc42-GTP : un rôle-clé dans la polarisation de l'ovocyte	79
B. Dépolarisation des phospho-ERMs, différents rôles envisagés	80
C. Régulation et rôles de l'acto-myosine lors de l'émission du 2^{ème} GP.	82
REFERENCES	85

ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxy Ribo Nucléique
ADP, ATP : Adenosine Di-Tri Phosphate
AKT : V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog
AMH : Anti Müllerian Hormone
AMPc : Cyclic Adenosine Monophosphate
APC/C : Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
aPKC : Atypical Protein Kinase C
ARN : Acide RiboNucléique
Arp2/3 : Actin-Related Proteins 2/3
ARPC1-5 : Actin-Related Protein Complex 1-5
BAX : BCL2-Associated X Protein
BCL-2 : B-Cell CLL/Lymphoma 2
BCLX : BCL2-Like
Bem1 : Bud Emergence Protein 1
Bik1 : Botrytis Induced Kinase 1
BMP-15 : Bone Morphogenetic Protein 15
Brat : Brain tumor protein
CD43-44 : Cluster of Differentiation 43-44
Cdc24, 25 et 42 : Cell division control protein 25-42
CDK1 : Cyclin Dependent Kinase 1
C-ERMAD : C-term ERM Associated Domain
CKII : Casein Kinase II
Cla4 : Serine/threonine-protein kinase CLA4
CPC : Chromosomal Passenger Complex
CRIB : Cdc42 Rac-1 Interactive Binding
Cyk4 : Protein CBR-CYK-4
CYP19 et 26B1 : Cytochrome P450
Dlg : Disc Large
DRFs : Diaphanous Related Formins
Ect-2 : Epithelial Cell Transforming Sequence 2
ERM : Ezrin Radixin Moesin
Erα et β : Estrogen Receptor
FERM : 4.1 Ezrin Radixin Moesin
FH1-2 : Formin Homology
FMN : Founding Mammalian Formins
FOXO3 : Forkhead Box O3
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer
FSH : Follicle Stimulating Hormone
FSHR : FSH Receptor
FZR1 : Fizzy/Cell Division Cycle 20 Related

GAP : GTPase Activating Protein
GBD : GTPase Binding Domain
GDF-9 : Growth Differentiation Factor 9
GDI : Guanine Dissociation Inhibitor
GDP : Guanine diphosphate
GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor
GMC : Ganglion Mother Cell
GPR1-2 : G-protein regulator 1-2
GTP : Guanine triphosphate
GV : Germinal Vesicle
GVBD : Germinal Vesicle Break Down
HURP : Hepatoma up-regulated protein
ICAM2 : Intercellular Adhesion Molecule 2
IGF-1 et 2 : Insulin Growth Factor
Insc : Inscuteable
Kar9 : Karyogamy protein 9
Khc73 : Kinesin-like protein 73
Kip2 : Kinesin Protein 2
KIT, KITL : V-Kit 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene Homolog Ligand
LET-99 : Protein CBR-LET-99
Lgl : Lethal Giant Larvae
LH : Luteinizing Hormone
LHR : LH Receptor
Lhx8 : LIM homeobox 8
LIMK : LIM domain kinase
LIN-5 : Spindle apparatus protein lin-5
LOK : Lymphocyte Oriented Kinase
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MCAK : Mitotic Centromer Associated Protein
mDIA1-3 : Mammalian Diaphanous
MLC2 : Myosin Light Chain 2
MLCK : Myosin Light Chain Kinase
Mos : V-Mos Moloney Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog
MPF : Mitosis Promoting Factor
MRCK : Myotonic dystrophy kinase-Related Cdc42-binding Kinase
MTOCs : MicroTubule Organizing Centers
mTORC1 : mammalian Target Of Rapamycin
Mud : Mushroom Body Defect
MYPT1 : MYosin Phosphatase Target subunit 1
MYT : Myelin Transcription Factor
Ndl1 : Nuclear distribution protein nudE homolog 1

NEBD : Nuclear Envelope Break Down
NLS : Nuclear Localization Sequence
Nobox : NOBOX Oogenesis Homeobox
NPFs : Nucleation Promoting Factors
Num1 : Nuclear Migration Protein
NuMA : Nuclear mitotic apparatus protein 1
NuSAP : Nucleolar And Spindle Associated Protein
N-WASP : Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein
Pac1 : Nuclear distribution protein PAC1 Polypeptide
PAK : P-21 Activated Kinase
PAR1-6 : Partitioning defective proteins
PDE3A : Phosphodiesterase 3A
PI3K : Phosphoinositide-3-Kinase
Pins : Partner of Inscuteable
Pip2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKA,B,C : Protein Kinase A,B,C
PLK1 : Polo Like Kinase 1
Pon : Partner of Numb
PP1 : Proteine Phosphatase 1
Pros : Prospero
Rac-1 : Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1
Ran : RAs-related Nuclear protein
RCC1 : Regulator Of Chromosome Condensation 1
RhoA : Ras Homology gene A
ROCK : Rho-Associated, Coiled-Coil Containing Protein Kinase
Sohlh1 : Spermato And Oogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix 1
SPB : Spindle Pole Body
STICS : SpatioTemporal Image Correlation Spectroscopy
TGFβ : Transforming Growth Factor β
TPX2 : Microtubule-Associated Xenopus homolog 2
UtrCH : Utrophine Calponin Homology
WASP : Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE2 : WASP-family verprolin-homologous protein-2
WH2 : WASP Homology
WHAMM : WASP homolog-associated protein with actin, membranes and microtubules
ZP1, 2 et 3 : zona pellucida glycoprotein

PROLOGUE

Tous les organismes se reproduisant de manière sexuée, connaissent deux grandes phases dans leur cycle de vie. Une phase haploïde résultant de la méiose et une phase diploïde débutant après la fécondation. La différence entre ces deux phases réside dans le nombre de versions (ou allèle) d'un gène présent au sein de la cellule. Les gènes étant portés par les chromosomes, on parlera d'haploïdie (n) quand la cellule ne comportera qu'une seule version d'un chromosome et de diploïdie ($2n$) quand celle-ci en comportera deux. La vie haploïde est une période de transition entre deux générations d'individus se déroulant à l'état de gamète. Chez les animaux (métazoaires), le gamète mâle est appelé spermatozoïde tandis que le gamète femelle est appelé ovocyte. Bien que tous deux porteurs de la moitié du patrimoine génétique du futur individu, les gamètes mâle et femelle diffèrent en de nombreux points. Le spermatozoïde est de petite taille et possède la capacité de se mouvoir grâce à son flagelle. L'ovocyte est en revanche immobile et beaucoup plus volumineux car il contient l'ensemble des ressources énergétique et métaboliques (protéines, ARN messagers, mitochondries...) qui seront nécessaires aux étapes précoces du développement du futur embryon. La rencontre et la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte marqueront les étapes ultimes de la vie haploïde et aboutiront à la formation du zygote, être monocellulaire diploïde à l'origine de l'ensemble des cellules du futur individu. C'est alors très tôt dans la vie embryonnaire qu'un nouveau cycle de vie débutera par la différenciation d'un type particulier de cellules appelées cellules germinales primordiales (primordial germ cells ou PGCs), qui seront à l'origine des futurs gamètes.

La méiose se caractérise par une succession de deux divisions cellulaires sans phase intermédiaire de réplication de l'ADN. Celle-ci a pour conséquence de réduire le nombre de chromosomes présents au sein des gamètes (haploïdisation), et de permettre la production d'un zygote diploïde suite à la fusion des génomes parentaux lors de la fécondation. La méiose intervient suite à une dernière réplication (pré-méiotique) de l'ADN des PGCs, qui comportent alors $2n$ chromosomes homologues (chacun issus de l'un des parents) à 2 chromatides ($2n2C$). La première division méiotique (méiose I) dite réductionnelle, entraîne la séparation des chromosomes homologues (reste $1n2C$), tandis que la deuxième division méiotique (méiose II) dite équationnelle, entraîne la séparation des chromatides sœurs d'un même chromosome (reste $1n1C$). Lors de la prophase I, l'appariement des chromosomes homologues autorise des transferts de matériel génétique par recombinaison homologue appelée « crossing over ». Ces échanges permettent la création de combinaisons alléliques

originales qui, avec la répartition aléatoire des chromosomes parentaux, constituent le brassage méiotique des gènes.

Lors de ma thèse, je me suis intéressé au caractère asymétrique des divisions méiotiques de l'ovocyte de souris. Cette asymétrie permet à l'ovocyte de conserver l'essentiel de ses ressources maternelles tout en expulsant son matériel génétique surnuméraire au sein de petits globules polaires. Pour cela, ce dernier dispose d'un processus de brisure de symétrie autonome (sans repères extérieurs) lui permettant de se polariser et de positionner son fuseau à proximité du cortex cellulaire. Ces deux événements sont, en effet, nécessaires à l'émission des globules polaires et s'auto-influencent de manière positive, notamment par l'intermédiaire des filaments d'actine.

Lors de l'introduction, nous aborderons, dans un premier temps, les phénomènes de croissance et de maturation ovocytaire et nous intéresserons, par la suite, aux processus de polarisation permettant l'émission des globules polaires. Dans une deuxième partie, nous détaillerons les mécanismes d'assemblage et d'organisation des réseaux de filaments d'actine et verrons en quoi la myosine et les GTPases de la famille Rho peuvent en modifier la dynamique. Enfin, nous terminerons cette introduction sur une description des mécanismes régulant la division asymétrique dans d'autres modèles cellulaires.

INTRODUCTION

A. Croissance et maturation ovocytaire

Bien que le spermatozoïde et l'ovocyte contribuent à parts égales au patrimoine génétique d'un nouvel individu, le gamète femelle fournit la totalité des facteurs cytoplasmiques (ARN messager, mitochondries, ribosomes...) qui seront nécessaires aux premiers stades du développement embryonnaire préimplantatoire. Pour ce faire, l'ovocyte des mammifères connaît une longue période de croissance, qui se déroule au sein du follicule ovarien. Cette structure, composée de cellules de soutien, fournit un environnement favorable à l'ovocyte et permet de réguler son développement. Peu de temps avant l'ovulation, l'ovocyte, jusqu'alors bloqué en prophase I, réamorce sa méiose et entre dans un processus de maturation. A l'issue de ce processus, le gamète devient compétent pour la fécondation et subit un nouvel arrêt de son cycle méiotique au stade métaphase II. La fixation du spermatozoïde lors de la fécondation sera alors nécessaire à la terminaison de la méiose ovocytaire.

1. Folliculogenèse

Chez la souris, la mise en place du follicule intervient peu de temps après la naissance, par le recrutement d'une couche de cellules folliculaires de soutien autour de l'ovocyte. A ce stade, les follicules sont dit primordiaux et restent dans un état de quiescence (pas de croissance de l'ovocyte et pas de prolifération des cellules folliculaires) jusqu'à l'activation de la folliculogenèse lors de la puberté. Le follicule se développe alors progressivement et accompagne la croissance de l'ovocyte. Le développement du follicule résulte de la prolifération des cellules folliculaires (granulosa) et de la mise en place d'une couche externe de cellules de la thèque. Chacun de ces deux types cellulaires somatiques, par l'apport de facteurs paracrines et/ou la mise en place de jonctions cellulaires participe à la régulation du développement ovocytaire. Les premières phases de la folliculogenèse dépendent majoritairement de facteurs paracrines synthétisés localement, tandis que la deuxième phase de ce processus est sous le contrôle des hormones gonadotropes FSH (Hormone Folliculo-Stimulante) et LH (hormone Lutéinisante) sécrétées par l'hypophyse.

a) Formation des follicules primordiaux

Durant la vie embryonnaire, les ovocytes s'organisent au sein des ovaires sous la forme d'amas dont la cohérence est assurée par des ponts cytoplasmiques mis en place lors des divisions prolifératives des PGCs. Le désassemblage de ces amas et l'individualisation des ovocytes sont alors

nécessaires au recrutement des premières cellules de soutien requises pour la formation du follicule primordial. L'initiation de ce processus nécessite l'action de facteurs de croissance de type TGF β (McMullen et al, 2001 ; Bristol-Gould et al, 2005 et 2006) et l'expression par l'ovocyte de gènes tels que : Sohlh1 et Lhx8 (Pangas et al, 2006), Fig α (Soyal et al, 2000), Nobox (Rajkovic et al, 2004). Cependant, une majorité des ovocytes (66%) ne survivent pas à ce processus (Pepling and Spadling, 2001), et connaissent une mort par apoptose dépendante de la balance entre les facteurs BCL-2/BCLX (anti-apoptotiques) et le facteur BAX (pro-apoptotique) (Ratts et al, 1995 ; Perez et al, 1999 ; Rucker 3rd et al, 2000), et de l'activation de la caspase 2 (Bergeron et al, 1998). Les raisons exactes d'un tel sacrifice sont encore méconnues, mais pourraient constituer une sélection précoce des meilleurs gamètes. Les follicules primordiaux ayant survécu constituent alors une réserve dont le contenu ne fera que diminuer au cours de la vie de l'individu.

b) Croissance folliculaire basale

A la puberté, les follicules primordiaux sont recrutés par petit groupe pour entrer dans le processus de la folliculogénèse. La première phase de ce processus, appelée croissance basale du follicule, s'effectue sous le contrôle de facteurs paracrines sécrétés localement au niveau des gonades. Elle se divise en deux stades distincts : le stade follicule primaire et le stade follicule secondaire. Le stade primaire est associé à l'organisation en épithélium des cellules folliculaires (mise en place de la granulosa), alors que le stade secondaire est caractérisé par la mise en place d'une couche externe de cellules de la thèque (Fig. 8). Ce dernier type de cellule favorise la prolifération des cellules folliculaires et assure la vascularisation du follicule. Pendant ce temps, l'ovocyte grossit rapidement et s'entoure de la zone pellucide, qui jouera un rôle majeur lors de la fécondation.

L'expression par les cellules folliculaires (granulosa) du facteur de croissance KITL est requise pour les premiers stades de la folliculogénèse. Ce facteur permet entre autre, la prolifération des cellules folliculaires et la mise en place des cellules de la thèque (Nilsson and Skinner, 2004). Son niveau d'expression est finement régulé par un système de rétrocontrôle impliquant les facteurs GDF-9 et BMP-15 synthétisés par le gamète (Carabatsos et al, 1998 ; Joyce et al, 2000 ; Otsuka and Shimasaki, 2002 ; Durlinger et al, 2002). Au niveau de l'ovocyte, KITL participe à la survie et la croissance du gamète par l'activation de la voie PI3K/AKT (Parrot and Skinner, 1999 ; Reddy et al, 2005). Cette activation aboutit à l'inhibition du facteur de transcription pro-apoptotique FOXO3 (Castrillon et al, 2003 ; Reddy et al, 2008), et à l'induction de la synthèse protéique via l'activation du complexe mTORC1 (Adhikari et Liu, 2010). Durant cette période de croissance, l'ovocyte sécrète des

glycoprotéines (ZP1-2-3) qui s'assemblent pour former la zone pellucide (Wassarman and Litscher, 2012). Afin de garder un contact physique avec le gamète, les cellules folliculaires mettent alors en place des jonctions de type GAP par la création de projections trans-zonales qui traversent la zone pellucide (Albertini et al, 2001 ; Eppig, 2001). Ce type de jonction est nécessaire au développement de l'ovocyte permettant l'apport de métabolites que le gamète est incapable de synthétiser (Su et al, 2009).

c) Croissance folliculaire terminale et ovulation.

A la fin de la croissance basale, le follicule secondaire acquiert la capacité de répondre aux hormones gonadotropes et se transforme progressivement en follicule tertiaire. Ce follicule, également appelé follicule antral ou follicule De Graaf, se caractérise par la formation d'une cavité interne appelée antrum (Fig. 8). La FSH joue un rôle essentiel dans cette réorganisation et contribue à la croissance du follicule. Cependant, une majorité de follicules ne survivent pas à ce processus et meurent selon un phénomène de sélection appelé atresie folliculaire. Les follicules survivants atteignent en définitive un stade dit pré-ovulatoire et libèrent le gamète au pic de LH.

Au début du cycle menstruel, l'augmentation de la FSH déclenche l'ultime étape de la folliculogenèse. Dans un premier temps, cette hormone agit au niveau des cellules folliculaires qui expriment son récepteur (FSHR) depuis le stade secondaire (Kumar et al, 1997 ; Dierich et al, 1998). Cette stimulation a pour conséquence d'induire la prolifération et la différenciation de la granulosa qui se subdivise alors en deux sous-populations : les cellules du cumulus qui entourent l'ovocyte, et les cellules murales qui tapissent la paroi interne du follicule. D'autre part et de manière indirecte, la FSH induit l'expression du récepteur de la LH (LHR) au niveau des cellules de la thèque (Knecht

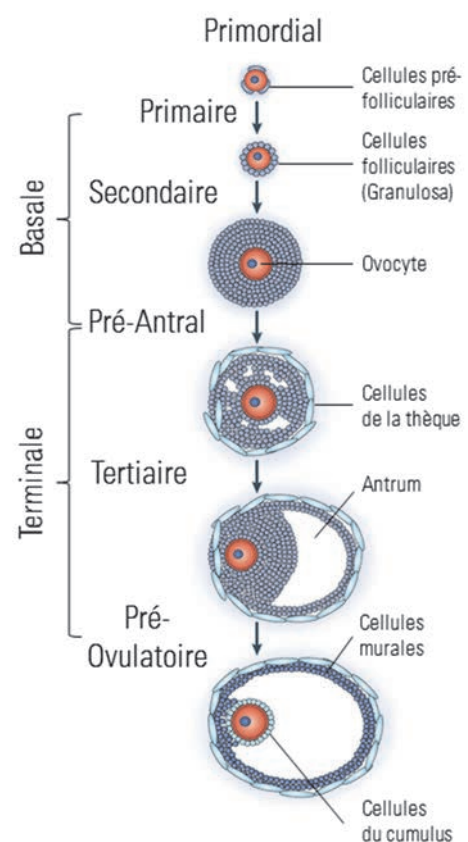


Figure 8 : Croissance Folliculaire

Schéma représentant les différents stades de la folliculogenèse. La croissance folliculaire basale débute à la puberté et repose sur des facteurs sécrétés localement au niveau des gonades. La croissance terminale du follicule repose quant à elle sur les hormones gonadotropes, de type FSH et LH, émis depuis l'hypophyse. L'ovulation marque alors l'ultime étape de la folliculogenèse. Adaptée de Li and Albertini, 2013.

and Catt, 1982 ; Segaloff and Limbird, 1983). De ce fait, et en réponse à de faibles doses de LH, la thèque commence à produire des androgènes qu'elle relâche dans l'antrum. Ces androgènes, sont alors pris en charge par les cellules folliculaires qui les transforment, via l'aromatase CYP19, en œstrogènes (Fisher et al, 1998). L'accumulation des œstrogènes contribue, par l'activation locale de ses récepteurs (ER α et ER β), à la croissance des follicules tertiaires (Lubahn et al, 1993 ; Krege et al, 1998 ; Dupont et al, 2000). Il est important de noter que l'ensemble de ces processus est également régulé par la sécrétion de facteurs locaux tels que GDF-9 et BMP-15, les IGF-1 et 2 ou encore l'AMH (Zhou et al, 1997 ; Otsuka et al, 2000 ; Yan et al, 2001 ; Durlinger et al, 2001).

Dans les dernières étapes de la croissance folliculaire, l'accumulation des œstrogènes et l'émission de facteurs tels que l'inhibine, exercent un rétrocontrôle négatif sur libération de FSH par l'hypophyse (McLachlan et al 1987 ; Buclker et al, 1989 ; Knight and Glister, 2001). La diminution du niveau de FSH disponible entraîne alors un stress responsable de la dégénérescence d'une majorité des follicules tertiaires (Chun et al, 1996). Ce phénomène d'atrésie folliculaire constitue, selon le modèle actuel, une étape de sélection permettant de favoriser les follicules dont la croissance est la plus avancée (Edson et al, 2009). Les follicules dominants ayant survécus à cette étape de sélection, atteignent en définitive le stade dit pré-ovulatoire et s'apprêtent à libérer le gamète. Une fois encore, les œstrogènes vont jouer un rôle essentiel dans ce processus, en favorisant un relargage massif de LH par l'hypophyse. C'est en effet le pic de LH qui sera le déclencheur de la rupture du follicule et par conséquent de l'ovulation.

2. Maturation et divisions asymétriques de l'ovocyte

Parallèlement au déclenchement de l'ovulation, le pic de LH a pour conséquence de réamorcer le cycle méiotique et d'induire la maturation ovocytaire. Ce processus comprend une succession de deux divisions cellulaires sans phase intermédiaire de réplication génomique permettant l'haploïdisation du gamète. Ces deux divisions aboutissent à l'émission de petits globules polaires contenant le matériel génétique surnuméraire. Le caractère fortement asymétrique de ces divisions permet à l'ovocyte d'économiser ses ressources cytoplasmiques en vue du futur développement embryonnaire. La maturation ovocytaire débute par la condensation des chromosomes et la rupture de la vésicule germinale (noyau des ovocytes). Ces deux événements sont nécessaires à la mise en place du fuseau méiotique qui, chez la souris, se forme au centre du gamète. Lors de la métaphase I (MI), le fuseau migre le long de son axe longitudinal pour rejoindre le cortex. L'ovocyte entre alors en anaphase

et expulse la moitié des chromosomes homologues dans le premier globule polaire. A l'issue de la première division méiotique, l'ovocyte reste bloqué au stade métaphase II (MII) et présente un fuseau excentré localisé à proximité et de manière parallèle au cortex. La reprise de la deuxième division méiotique intervient suite à la fécondation et se caractérise par la rotation du fuseau de MII, la séparation des chromatides sœurs et l'expulsion du deuxième globule polaire (Fig. 9).

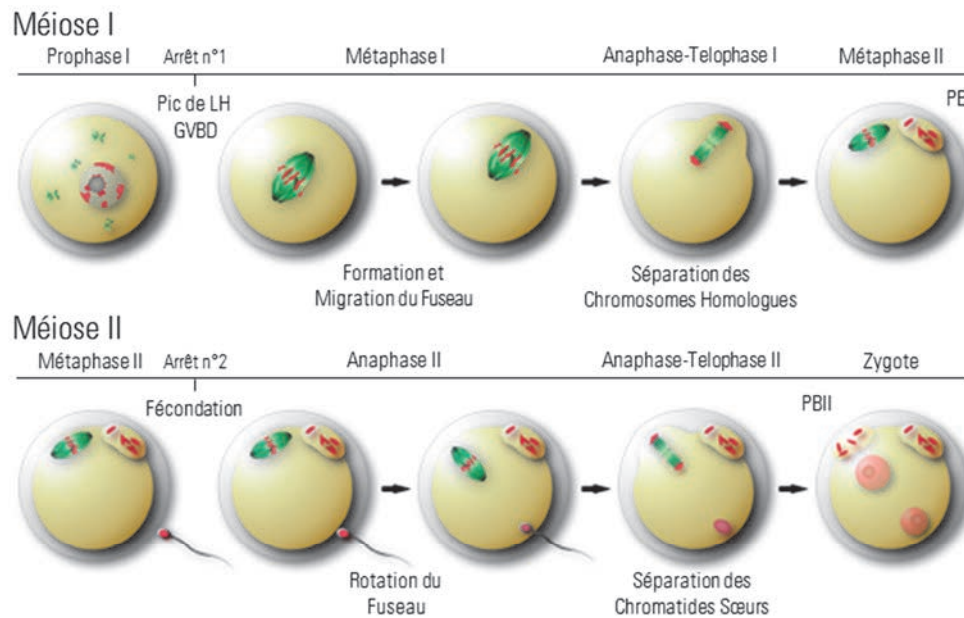


Figure 9 : Déroulement de la maturation ovocytaire

Représentations schématiques des différentes étapes de la maturation ovocytaires et de l'expulsion des globules polaires de l'ovocyte de souris. La première division méiotique est représentée sur le panneau supérieur, tandis que la deuxième division méiotique est représentée sur le panneau inférieur. Adapté d'un schéma original de Mélina Schuh.

a) Régulation du cycle méiotique en prophase I

Comme nous l'avons vu précédemment, le cycle méiotique connaît un arrêt prolongé suite aux événements de recombinaison lors du stade diplotène (dictyotène) de la prophase I. Cette période de blocage permet à l'ovocyte de profiter de l'état faiblement condensée de la chromatine pour transcrire les gènes qui seront nécessaires à sa croissance. Le maintien de cet arrêt requiert l'inhibition d'un complexe appelé le MPF (Mitosis Promoting Factor), qui se compose de la kinase CDK1 et de sa sous unité régulatrice la cycline B. Le pic pré-ovulatoire de LH permettra alors la réactivation du MPF, ce qui aura pour conséquence de réamorcer le cycle méiotique et d'entraîner le gamète femelle vers un processus de maturation ovocytaire.

Lors de l'arrêt de prophase I, le maintien d'une forte concentration intracellulaire en AMPc est une condition nécessaire à l'inhibition de l'activité du MPF (Downs et al, 1989 ; Nogueira et al, 2003).

La synthèse de ce second messager repose sur la dégradation de l'ATP par l'adényl-cyclase qui, dans le cas de l'ovocyte, est activé par les récepteurs couplés à la protéine G, GPR3 et GPR12 (activité constitutive) (Mehlmann et al, 2002 et 2004 ; Mehlmann, 2005a ; Vaccari et al, 2008). En plus de cette synthèse endogène, le gamète bénéficie, par l'intermédiaire des jonctions GAP (TZP), d'un soutien en provenance des cellules folliculaires (Sela-Abramovich et al, 2006). Ce soutien, nécessaire à l'arrêt du cycle méiotique, se matérialise par un apport direct en AMPc et un afflux de GMPc responsable de l'inhibition de la phosphodiesterase PDE3A

(enzyme dégradant l'AMPc) (Masciarelli et al, 2004 ; Norris et al, 2009 ; Vaccari et al, 2009). En s'accumulant, l'AMPc se lie au niveau de la sous-unité régulatrice de la kinase PKA et autorise son activation (Kirschner et al, 2009). Cette kinase agit en faveur de l'inhibition du MPF, et constitue, de ce fait, un lien entre l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc et l'arrêt du cycle méiotique. Pour ce faire, PKA agit de manière indirecte sur le maintien des phosphorylations inactivatrices (Thr14 et Tyr15) de la sous-unité catalytique du MPF (CDK1). Lors de la mitose, le maintien de ces deux phosphorylations repose sur l'activation du complexe kinase Wee/MYT et l'inactivation de la phosphatase CDC25 (Krek and Nigg, 1991a 1991b ; Norbury et al, 1991 ; Sebastian et al, 1993). Au sein de l'ovocyte, PKA permet de réguler ces deux facteurs de la sorte en : phospho-activant Wee1B (Han et al, 2005) et phospho-inactivant CDC25B (Fig. 10) (Duckworth et al, 2002 ; Pirino et al, 2009).

En plus de la voie AMPc/PKA, l'ovocyte dispose d'une seconde voie qui permet, via une dégradation permanente de la cycline B, d'inhiber l'activité du MPF. Cette seconde voie repose sur l'activité E3 ubiquitine-ligase du complexe de l'APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) permettant d'entraîner ses substrats vers une voie de dégradation dépendante du protéasome 26S (Fig. 10) (Peters, 2006). Durant l'arrêt de prophase I, l'activité de l'APC/C, ainsi que son affinité pour la cycline B, requiert l'interaction du complexe avec sa sous-unité régulatrice FZR1 (Cdh1) (Reis et al, 2006 ; Holt et al, 2011). L'observation d'une reprise prématurée de la méiose en cas de surexpression

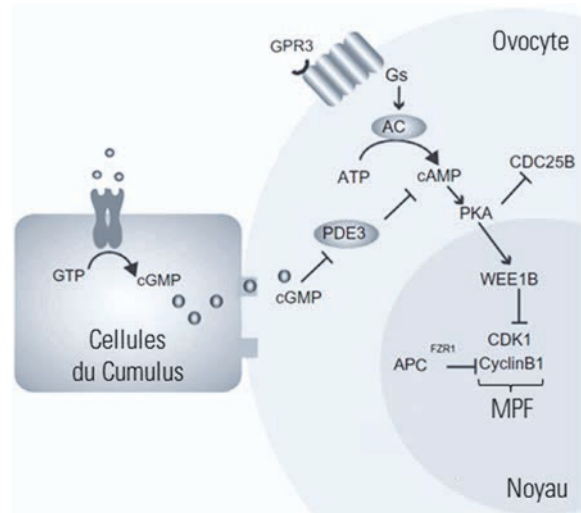


Figure 10 : Arrêt du cycle méiotique en prophase I

L'ovocyte connaît un arrêt de son cycle méiotique lors de la prophase I. Ce blocage repose sur l'inhibition/dégradation des sous unités du MPF. La voie AMPc/PKA aboutit à l'inhibition de CDK1, tandis que l'APC/C couplé à son régulateur FZR1 permet la dégradation de la cycline B par le protéasome. Adaptée de Holt et al, 2013.

de la cycline B permet de révéler le caractère essentiel de cette seconde voie pour l'inhibition du MPF et l'arrêt du cycle méiotique (Ledan et al, 2001 ; Marangos and Carroll, 2004).

Consécutivement au pic de LH, la diminution de la concentration intra-ovocytaire d'AMPc a pour conséquence de lever l'inhibition pesant sur le MPF et de permettre la reprise du cycle méiotique (Mehlmann, 2005b). De par l'absence de récepteur LHR à la surface du gamète, cet effet de la LH est nécessairement indirect et requiert la mise en place d'une signalisation de type EGF entre les cellules folliculaires externes et les cellules du cumulus (Park et al, 2004 ; Ashkenazi et al, 2005). Cette signalisation a pour conséquence de faire diminuer la production de GMPc au niveau des cellules du cumulus et d'entraîner la fermeture des jonctions GAP les reliant à l'ovocyte. En conséquence, la phosphodiesterase PDE3A, jusqu'alors inhibée, se réactive au sein du gamète et dégrade rapidement l'AMPc (Norris et al, 2009 ; Vaccari et al, 2009 ; Robinson et al, 2012).

b) Rupture de la vésicule germinale (GVBD)

En dehors des phases de division cellulaire, le noyau des cellules eucaryotes permet d'isoler le matériel génétique du contenu cytoplasmique. Cette compartimentation est à l'origine d'un découplage entre les processus de transcription et de traduction, et autorise de ce fait un niveau supérieur de régulation de l'expression génétique (Dultz and Ellenberg, 2007). L'ADN des ovocytes bloqués au stade prophase I est également isolé du reste de la cellule au sein d'un noyau de très grande taille appelé vésicule germinale (Germinal Vesicle, GV). Lors de la folliculogenèse, la GV se présente dans une conformation dite « nucléole non entouré » caractéristique d'un état faiblement condensé de la chromatine. Cette conformation autorise l'activité transcriptionnelle nécessaire à l'expression des gènes requis pour la croissance ovocytaire. Peu de temps avant la reprise du cycle méiotique, la GV se réorganise et acquiert une conformation dite « nucléole entouré ». Dans cette nouvelle configuration, le niveau de condensation supérieure de la chromatine s'oppose à toute activité transcriptionnelle et permet de conditionner le matériel génétique en vue de la maturation ovocytaire (Zuccotti et al, 2005). La rupture de la vésicule germinale (Germinal Vesicle Break Down, GVBD) marque le début des événements de maturation et s'accompagne d'une réorganisation de la structure interne du gamète.

Des études réalisées chez l'étoile de mer et la souris ont permis de mettre en évidence un processus séquentiel dans le déroulement de la GVBD au sein de l'ovocyte (Terasaki et al, 2001 ; Lénart et al, 2003 ; Azoury et al, 2011). Dans chacun des cas, le suivi de molécules fluorescentes a permis de souligner une perte de sélectivité des imports/exports nucléaires préalables au désassemblage visible

de la GV. Cette série d'évènements présente de fortes similitudes avec les mécanismes régissant la rupture pré-métaphasique de l'enveloppe nucléaire (Nuclear Envelope Break Down, NEBD) des cellules somatiques. Par analogie, nous pouvons donc supposer que, comme lors de la NEBD, la perte de sélectivité de la GV corresponde à une perturbation locale de la membrane résultant du démantèlement des pores nucléaires (canaux de transit entre le noyau et le cytoplasme) (Dultz et al, 2008 ; Katsani et al, 2008). Dans le cas de la NEBD, cette perturbation est à l'origine de la pénétration de facteurs tels que le MPF qui, via l'activité kinase de CDK1, induit le désassemblage complet de l'enveloppe nucléaire par la phosphorylation des lamines (Peter et al 1990 ; Heald and McKeon, 1990). L'observation d'une telle relocalisation précoce du MPF au sein d'ovocytes d'échinodermes semble confirmer l'existence d'un mécanisme commun gouvernant la NEBD et la GVBD (Ookata et al, 1992 ; Hinchcliffe et al, 1999 ; Lénart and Ellenberg, 2003). Lors de la GVBD, l'ovocyte connaît également une profonde modification de son architecture interne qui semble intervenir en préparation de l'assemblage du fuseau méiotique. Cette réorganisation s'opère notamment au niveau du réticulum endoplasmique (FitzHarris et al, 2007) et des éléments du cytosquelette : microtubules (Schuh and Ellenberg, 2007) et filaments d'actine (Azoury et al, 2011 ; Okada et al, 2012).

c) Formation du fuseau méiotique

Lors de la division cellulaire la répartition égale du matériel génétique est une condition impérative au maintien de la stabilité des génomes. A cette fin, la cellule assemble une structure bipolaire dynamique fournissant à la fois l'ossature, les forces, et les points de contrôle nécessaires à une ségrégation adéquate des chromosomes dupliqués. Cette structure, appelée fuseau de division, se met en place à partir de la prométaphase et se compose essentiellement de microtubules et de protéines régulatrices associées (Helmke et al, 2013).

Selon nos connaissances actuelles, deux voies différentes agissent, le plus souvent de manière simultanée, pour garantir l'assemblage correct du fuseau. La première d'entre elles, dépend d'un mécanisme dit de « recherche et capture » où des microtubules, émis depuis les centrosomes (centres de nucléation des microtubules), sont stabilisés de manière sélective (Mitchison and Kirschner, 1985). Ce système repose sur la capacité des microtubules à explorer leur environnement suite à des phases de polymérisations et de dépolymérisations successives (instabilité dynamique) (Holy and Leibler, 1994). Lorsque les microtubules rencontrent aléatoirement les chromosomes, ils établissent des connections avec une structure multi-protéique associée au centromère, et appelée kinétochore. Cette interaction a pour conséquences de stabiliser les microtubules, permettant ainsi la

formation progressive du fuseau de division. La bipolarité du fuseau repose alors sur la présence invariable de deux centrosomes. D'autre part, des expériences réalisées en extrait cellulaire d'ovocytes de xénope ont démontré que des microtubules nucléés autour de billes recouvertes d'ADN pouvaient également s'organiser en un fuseau bipolaire et ce en absence de kinétochore et de centrosomes (Heald et al, 1996). Ces observations ont permis de mettre en évidence l'existence d'une deuxième voie de formation du fuseau, dite « d'auto-assemblage », résultant d'une origine chromatinienne de nucléation des microtubules. L'activation de la Rho GTPase Ran (Ran-GDP ^{inactif} Ran-GTP ^{actif}) au niveau des chromosomes par son facteur d'échange (Guanine nucleotide Exchange Factor, GEF) RCC1, joue un rôle central dans ce processus (Ohtsubo et al, 1989 ; Halpin et al, 2011). Ran-GTP permet en effet le relargage, sous la forme d'un gradient centré autour de la chromatine, de facteurs d'assemblage du fuseau jusqu'alors séquestrés par les importines α et β (Caudron et al, 2005 ; Kalab and Heald, 2008). Certains de ces facteurs, favorisant la formation et la stabilisation des microtubules, ont pu être identifiés : TPX2 (Gruss et al, 2001 ; Schatz et al, 2003), HURP et NuSAP (Silljé et al, 2006 ; Song and Rape, 2010). Cependant, l'origine exacte du nucléateur de microtubule agissant en aval de Ran-GTP reste encore à déterminer. En plus de Ran et des importines α et β , la voie « d'auto-assemblage » du fuseau nécessite l'activité du complexe des protéines « passagères », localisé au niveau des centromères (Chromosomal Passenger Complex, CPC) (Sampath et al, 2004 ; Gadea and Ruderman, 2005). L'activité kinase de ce complexe, portée par Aurora B, permet en effet la phosphorylation inactivatrice des protéines Op18/Stathmin et MCAK qui possèdent une activité de dépolymérisation des microtubules (Gadea and Ruderman, 2006 ; Ohi et al, 2004). Il convient de noter que le CPC, en favorisant l'interaction entre le kinétochore et les microtubules, est également nécessaire à la voie « recherche et capture », faisant de ce complexe un acteur essentiel de l'assemblage du fuseau dans tous les contextes (Ruchaud et al, 2007).

Chez les mammifères, ainsi que dans la majorité des autres espèces étudiées, le gamète femelle est dépourvu de centrosomes (absence de centrioles) (Manandhar et al, 2005). Dans ce contexte, l'assemblage du fuseau méiotique repose sur la coopération de nombreux centres organisateurs des microtubules (Microtubules Organizing Centers, MTOCs), qui de par leur composition (γ -tubuline et péricentrine) permettent de remplacer les centrosomes en tant que nucléateur (Gueth-Hallonet et al, 1993 ; Carabastos et al, 2000). Chez la souris, peu de temps après la reprise du premier cycle méiotique, environ de 80 MTOCs se forment *de novo* à partir de résidus microtubulaires cytoplasmiques (Schuh and Ellenberg, 2007). Lors de la GVBD, les MTOCs, alors positionnés en périphérie de l'ovocyte, s'agrègent de manière centripète autour des chromosomes, sous l'action de la

dynéine (Courtois et al, 2012). Cette agglomération a pour conséquence de faire apparaître un amas sphérique au centre de l'ovocyte qui persiste pendant 2 à 3 heures. A l'issue de cette période, les chromosomes se positionnent en périphérie des microtubules et l'amas, sous l'action de la kinésine 5, s'étire selon un axe longitudinal préférentiel. La bipolarité s'acquiert alors progressivement, et ce n'est que vers 5 heures après la GVBD, que la majorité des ovocytes présente un fuseau méiotique strictement bipolaire (Fig. 11) (Schuh and Ellenberg, 2007). L'absence, durant les premières heures de ce processus, d'interactions stables entre les microtubules et les kinétochores semble indiquer que la voie chromatinienne « d'auto-assemblage » du fuseau prédomine au sein de l'ovocyte de souris (Brunet et al, 1999 ; Kitajima et al, 2011). Cette hypothèse est en partie appuyée par le rôle indispensable de facteurs d'assemblages locaux dans le maintien de l'intégrité du fuseau : TPX2 (Brunet et al, 2008), HURP (Breuer et al, 2010) et NuMA (Kolano et al, 2012). Cependant, malgré l'existence d'un gradient de Ran-GTP généré par la chromatine, ce dernier ne semble pas jouer un rôle indispensable dans l'assemblage du fuseau de méiose I. En effet, l'inhibition de la signalisation Ran-GTP n'entraîne que des perturbations mineures et un léger retard d'assemblage du fuseau (Dumont J et al, 2007a ; Schuh M and Ellenberg J, 2007). L'action des kinases Aurora est en revanche nécessaire à l'assemblage correct d'un fuseau bipolaire, la régulation des attachements kinétochores-microtubules et l'accomplissement de la méiose I de l'ovocyte de souris (Swain JE et al, 2008 ; Shuda K et al, 2009 ; Davydenko et al 2013 ; Balboula et Schindler 2014). De plus, Aurora B est nécessaire pour la formation d'un fuseau bipolaire de taille normale dans l'ovocyte de Xénope, notamment en inhibant MCAK, dont l'activité de dépolymérisation des microtubules induit la formation de fuseau très courts et/ou monopolaires (Shao et al 2012).

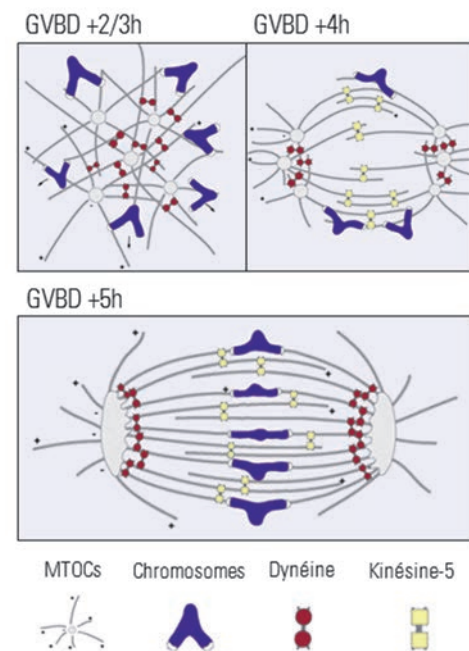


Figure 11 : Assemblage du fuseau

L'assemblage du fuseau dans l'ovocyte de souris repose sur l'agglomération de nombreux centres nucléateurs des microtubules (MTOCs). Les moteurs moléculaires dynéine et kinésine sont respectivement nécessaires au processus d'agrégation des MTOCs et à la bipolarisation du fuseau méiotique. Adaptée de Schuh and Ellenberg 2007.

d) Positionnement asymétrique du fuseau

Lors des deux phases méiotiques (méiose I et méiose II), l'asymétrie des divisions méiotiques repose sur le positionnement excentré du fuseau au sein du gamète. En se localisant de la sorte, le fuseau induit, en effet, une polarisation du cortex ovocytaire qui permettra de délimiter le site d'émission des futurs globules polaires. Dans de nombreux modèles de division, le positionnement du fuseau repose sur la mise en place d'interaction entre le cortex cellulaire et les microtubules astraux émanant des centrosomes (Siller and Doe, 2009). Cependant, le positionnement du fuseau dans l'ovocyte, de par l'absence de ces éléments (centrosomes et microtubules astraux), dépend d'un mécanisme alternatif. Ce sont en effet, les filaments d'actine qui, lors des deux divisions méiotiques, assurent le déplacement du fuseau au sein du gamète (Longo and Chen, 1985 ; Yi et al, 2011). Ce rôle prépondérant de l'actine a pu être observé dans de nombreuses espèces de mammifères et a fait le cas d'études particulièrement détaillées chez la souris.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'assemblage du fuseau méiotique au sein de l'ovocyte de souris intervient quelques heures après la GVBD dans la région centrale du gamète. Lorsque le fuseau acquiert une configuration bipolaire (GVBD+4/5h), celui-ci entame un processus de migration qui va le conduire progressivement vers le cortex ovocytaire (GVBD+7/8h). De manière systématique, le déplacement du fuseau s'effectue dans le prolongement de son axe longitudinal et en direction de la région corticale la plus proche (Verlhac et al, 2000 ; Schuh and Ellenberg, 2008). Des expériences de désassemblage du fuseau par des agents dépolymérisant des microtubules (colchicine ou nocodazole), ont permis de mettre en évidence une capacité intrinsèque des chromosomes à rejoindre le cortex ovocytaire (Longo and Chen, 1985 ; Van Blerkom and Bell, 1986). Cette migration des chromosomes seuls est, en revanche, entièrement bloquée par la dépolymérisation (cytochalasine B) ou la stabilisation (jasplakinolide) des filaments d'actine (Terada et al, 2000 ; Verlhac et al, 2000 ; Li et al, 2008). Conjointement, ces observations suggèrent que le processus de migration du fuseau méiotique dans l'ovocyte de souris repose principalement sur la dynamique des filaments d'actine. Cette hypothèse a pu être validée suite à l'identification et à l'inactivation génétique de facteurs nucléateurs de l'actine nécessaires au processus de migration : la formine-2, Spire 1 et 2 (Leader et al, 2002 ; Dumont et al, 2007b; Pfender et al, 2011). Ces trois facteurs agissent en coopération et permettent d'assembler un réseau de filaments d'actine cytoplasmiques s'organisant autour de vésicules (Schuh, 2011 ; Holubcová et al, 2013). L'utilisation de la sonde UtrCH, se fixant spécifiquement sur les filaments d'actine (Burkel et al, 2007), a permis de visualiser ce réseau dans des ovocytes vivants et d'apporter des précisions quant à la nature des mécanismes gouvernant la migration du fuseau (Azoury et al,

2008 ; Schuh and Ellenberg, 2008). Ces deux études ont abouti à l'élaboration d'un modèle similaire stipulant que de la myosine 2, localisée aux pôles du fuseau, exerce une force de traction sur le réseau cytoplasmique d'actine permettant de déplacer le fuseau. Les interactions dynamiques de ce réseau avec le cortex ovocytaire permettent ensuite d'orienter le fuseau en périphérie du gamète (Fig.12). L'absence de migration en cas d'inhibition de la myosine 2 (ML-7 inhibiteur de MLCK, Myosin Light Chain Kinase) ainsi que l'invagination du cortex à l'approche du fuseau permettent d'appuyer ce modèle de traction des pôles (Azoury et al, 2008 ; Schuh and Ellenberg, 2008). Plus récemment, l'utilisation d'un nouvel inhibiteur du complexe de nucléation Arp2/3, CK-666 (Nolen et al, 2009), a permis de souligner l'importance d'une autre sous population de filaments d'actine dans l'établissement de l'asymétrie de la première division méiotique (Sun et al, 2011a,b,c). Au sein de l'ovocyte, ce complexe de nucléation est responsable d'une réorganisation corticale comprenant à la fois l'exclusion progressive de la myosine 2 et l'épaississement de l'actine. Ces modifications ont pour conséquence d'entraîner une diminution de la tension corticale qui s'est avérée être nécessaire à la migration du fuseau méiotique (Chaigne et al, 2013). L'ensemble des modifications dépendantes du complexe de nucléation Arp2/3 requiert l'activation de la voie Mos/MAPK. MAPK est en effet directement nécessaire à la phosphorylation activatrice de Arp2/3, ou indirectement via l'un de ses régulateurs en amont, Wave2 (Chaigne et al, 2013).

Après l'émission du premier globule polaire, un nouveau fuseau s'organise rapidement autour des chromosomes préservés au sein de l'ovocyte. Chez la souris, le fuseau de métaphase II se positionne de manière asymétrique et parallèle au cortex ovocytaire. Cette localisation sous-corticale du fuseau de MII joue, au même titre que la migration du fuseau de MI, un rôle essentiel dans l'asymétrie des divisions méiotiques. Une perte de la localisation asymétrique du fuseau de MII est d'ailleurs fréquemment observée dans des ovocytes issus de femelles d'âge avancé, et est associée à une diminution des capacités reproductives (Webb et al, 1986 ; Kim et al, 1996 ; Miao et al, 2009). Récemment une étude a démontré le rôle nécessaire du complexe de nucléation Arp2/3 dans ce processus (Yi et al, 2011). En effet l'inhibition de ce complexe entraîne le détachement et la relocalisation centrale du fuseau. Dans le contexte de la MII, Arp2/3 est responsable de la polymérisation polarisée de filaments d'actine au niveau du cortex surplombant le fuseau. Cette polymérisation est à son tour responsable d'un flux d'actine qui se transmet à l'ensemble du gamète. La caractérisation par STICS (SpatioTemporal Image Correlation Spectroscopy) et la modélisation mathématique de ce flux semblent indiquer que ce dernier soit en mesure de positionner de manière passive le fuseau à proximité du cortex ovocytaire (Yi et al, 2011). Plus récemment encore, la même

équipe a publié une nouvelle étude appliquant ces principes à la migration du fuseau de MI (Yi et al, 2013). Leurs observations aboutissent à un modèle alternatif de positionnement du fuseau (s'appliquant à la MI et à la MII) selon lequel la polarisation du complexe nucléateur Arp2/3 aboutit, via la polymérisation d'actine, à la création d'un flux cytoplasmique permettant une capture corticale du fuseau (Fig. 12). Contrairement au modèle de traction des pôles, où l'activité de la myosine 2 est essentielle, les flux cytoplasmiques permettent d'expliquer la capacité des chromosomes à rejoindre le cortex ovocytaire lors de la MI en dépit de l'inhibition de l'activité contractile de la myosine 2 (blebbistatine) (Li et al, 2008). Cependant, rien ne permet à l'heure actuelle de favoriser l'un ou l'autre de ces modèles et la possibilité d'une coopération entre ces deux mécanismes est tout à fait envisageable.

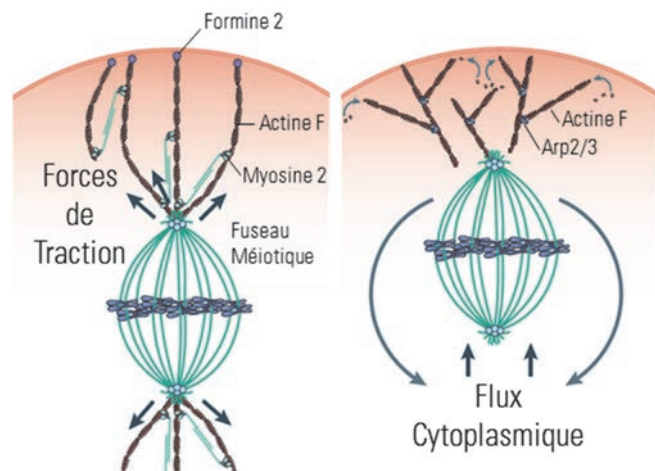


Figure 12 : Positionnement du fuseau méiotique

Deux modèles différents ont été proposés pour expliquer comment les filaments d'actine permettent de réguler le positionnement du fuseau au sein de l'ovocyte de souris. Le premier, à gauche sur la figure, repose sur la mise en place de forces de traction résultant d'une activité myosine 2 aux pôles du fuseau. Le deuxième, à droite, repose quant à lui sur la mise en place d'un flux cytoplasmique, engendré par une polymérisation polarisée de filaments d'actine dépendante du complexe de nucléation Arp2/3. Adaptée de Li and Albertini, 2013.

e) Polarisation du cortex ovocytaire

L'ovocyte de souris bloqué au stade MII présente une polarisation de la région corticale surplombant le fuseau méiotique se caractérisant notamment par : une exclusion des granules corticaux, une absence de microvillosités et une réorganisation du cytosquelette d'acto-myosine (Longo and Chen, 1985 ; Maro et al, 1986 ; Simerly et al, 1998). Cette polarisation repose sur la proximité corticale du fuseau méiotique et s'acquiert progressivement au cours de la migration du fuseau de MI (Verlhac et al, 2000). Des expériences de désassemblage du fuseau (colchicine et nocodazole) ont permis de révéler le rôle central de la chromatine dans ce phénomène. En effet, une fois libérés des microtubules, les chromosomes conservent la capacité d'induire une polarisation du cortex ovocytaire (Longo and Chen, 1985 ; Maro et al, 1986). Cet effet de la chromatine repose, comme lors de l'assemblage du fuseau, sur la mise en place d'un gradient de Ran-GTP autour des chromosomes (Fig. 13). L'inhibition de ce gradient, par la surexpression d'une forme dominante

négative de Ran (RANT24N), aboutit effectivement à une perte complète de la polarité de l'ovocyte MII (Deng et al, 2007). De manière intéressante, l'injection de billes recouvertes d'ADN permet d'obtenir une polarisation artificielle de l'ovocyte. L'intensité de cette polarité est alors directement proportionnelle à la quantité d'ADN injectée, et est favorablement influencée par le rapprochement des billes avec le cortex ovocytaire (Deng et al, 2007).

L'absence de fixation des spermatozoïdes dans la région corticale surplombant le fuseau méiotique, a permis de fournir une première hypothèse quant à la fonction de la polarisation de l'ovocyte (Johnson et al, 1975). Cette polarisation se caractérise en effet par une absence de microvillosités, dont la présence est requise pour l'interaction entre les gamètes mâles et femelle (Wilson and Snell, 1998 ; Runge et al, 2006). De ce fait, la polarisation protège l'ovocyte de toute interférence que pourrait provoquer l'incorporation des chromatides paternels au niveau de son fuseau méiotique. D'autre part, la polarisation participe très probablement au positionnement asymétrique du fuseau méiotique au sein de l'ovocyte. L'une des conséquences les plus évidentes de la polarisation est la formation d'un épais dôme d'actine (actin cap) surplombant le fuseau méiotique. La formation de ce dôme repose sur la mise en place d'une polymérisation polarisée de filaments d'actine par le complexe Arp2/3 (Yi et al, 2011). Comme nous l'avons vu précédemment, l'inhibition de ce complexe par le CK-666 entraîne un défaut de migration du fuseau de MI et une

relocalisation centrale du fuseau de MII (Yi et al, 2011 et 2013 ; Chaigne et al, 2013). De manière intéressante, le positionnement asymétrique du fuseau, porteur des chromosomes et du gradient de Ran-GTP, favorise la polarisation de l'ovocyte (Verlhac et al, 2000). Nous pouvons donc supposer que ces deux phénomènes sont liés par un processus d'auto-amplification permettant de garantir l'asymétrie des divisions méiotiques de l'ovocyte de souris. Enfin, la localisation polarisée de certains facteurs tels que PAR3 et mPARD6b (Duncan et al, 2005 ; Vinot et al, 2004) ou encore la Rho GTPase Rac-1 (Halet and Carroll, 2007) suggère un rôle de la polarisation de l'ovocyte lors de l'émission des globules polaires. En effet, ces deux familles de protéines (PAR et Rho GTPases) sont connues pour réguler la division asymétrique, notamment lors des premières divisions embryonnaires chez *C.elegans*

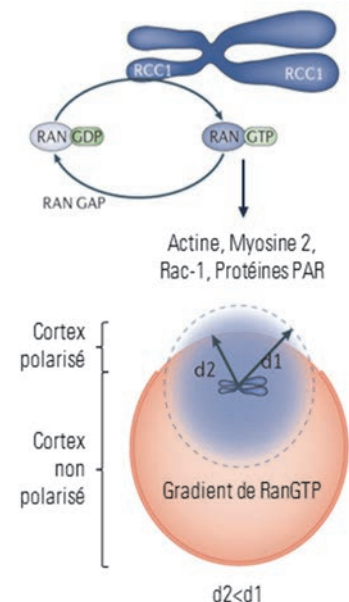


Figure 13 : Polarisation de l'ovocyte

Au sein de l'ovocyte de souris, les chromosomes induisent une polarisation du cortex ovocytaire dépendante d'un gradient de Ran-GTP. Ce gradient est centré sur les chromosomes de par la présence du facteur d'échange RCC1 sur ces derniers. Adaptée de Li and Albertini, 2013.

ou encore lors de la neurogenèse chez *D.melanogaster* (Munro and Bowerman, 2009 ; Goley and Welch, 2006). Dans un contexte méiotique, l'ovocyte de *X.laevis* a fourni de nombreux éclaircissements sur l'action des Rho GTPases au cours des divisions asymétriques du gamète femelle (Liu, 2012). Dans ce modèle, l'émission des globules polaires repose sur l'action combinée de deux Rho GTPase : Cdc42 et RhoA. La GTPase Cdc42 favorise, via l'induction d'une polymérisation polarisée de filaments d'actine, la protrusion membranaire des globules polaires. La GTPase RhoA, quant à elle, forme un anneau autour de Cdc42 et permet la constriction de l'anneau de cytotélière (Ma et al, 2006 ; Zhang et al, 2008). Dans l'ovocyte de souris, ces deux GTPases semblent également participer au processus de division méiotique, notamment concernant le positionnement et la morphologie du fuseau : Cdc42 (Na and Zernicka-Goetz, 2006 ; Cui et al, 2007) et l'émission du premier et du deuxième globule polaire : RhoA (Elbaz et al, 2009 ; Zhong et al, 2005). Cependant, les mécanismes par lesquels ces deux GTPases agissent au sein de l'ovocyte de souris restent encore méconnus.

B. Les réseaux d'acto-myosine

L'actine est une protéine présente dans toutes les cellules de l'organisme et possède la capacité de s'assembler en filaments dynamiques. Les filaments d'actine forment avec les microtubules et les filaments intermédiaires, le cytosquelette des cellules. De nombreuses protéines partenaires permettent de moduler la forme et la dynamique des structures formées par les filaments d'actine et leur permettent ainsi de participer à une grande variété de processus cellulaires tels que : le positionnement et le déplacement des cellules au sein des tissus, la division cellulaire ou encore le trafic vésiculaire. Le caractère dynamique des filaments d'actine repose sur leur capacité à se polymériser/dépolymériser rapidement, et sur l'activité contractile de leur moteur moléculaire associé : la myosine.

1. Assemblage et organisation des filaments d'actine

Quand elle est associée à l'ATP, l'actine monomérique (actine G) s'assemble en filaments hélicoïdaux (actine F) à partir d'une concentration critique de monomères. L'association en dimère de l'actine G, qui constitue la première étape de ce processus, est défavorable d'un point de vue thermodynamique et requiert la fixation d'un troisième monomère pour être stabilisée. Pour contrer cette instabilité, la cellule dispose de protéines dites de nucléation, favorisant l'apparition de ces trimères. Une fois assemblés, les filaments présentent une polarité dépendante de l'orientation des monomères d'actine qui les composent (Fig. 14). En effet, ces derniers s'orientent tous dans la même

direction et permettent de définir l'extrémité barbée (+), présentant un fort taux de polymérisation, et l'extrémité pointue (-), présentant un plus faible taux de polymérisation (10 fois inférieur à l'extrémité barbée). Une fois incorporés dans un filament, les monomères d'actine hydrolysent progressivement leur ATP en ADP et se libèrent d'un phosphate

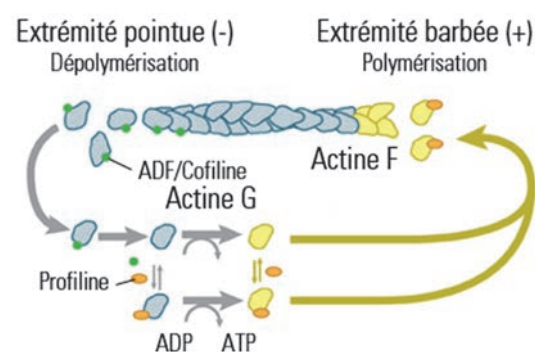


Figure 14 : Dynamique d'assemblage des filaments d'actine

Les filaments d'actine sont des structures dynamiques en perpétuel renouvellement. Ils se polymérisent principalement au niveau de leur extrémité barbée (+) par l'incorporation de monomères d'actine G liés à l'ATP. L'hydrolyse progressive de l'ATP des monomères entraîne alors, un vieillissement des filaments, qui favorise l'action de facteurs de désassemblage tel que l'ADF/cofiline. Les monomères ainsi libérés, sont pris en charge par la profiline qui permet leur recyclage en favorisant l'échange de l'ADP en ATP. Adaptée de MBInfo, Mechano-biology Institute, Singapore.

inorganique (Pi) au bout d'un temps donné (6 à 9 minutes). Les régions les plus anciennes des filaments (ADP) sont alors préférentiellement désassemblées, ce qui permet le maintien d'une forte concentration de monomères cytoplasmiques pouvant être rapidement mobilisés dans l'assemblage de nouvelles structures.

a) Facteurs de nucléation

L'un des principaux facteurs de nucléation des filaments d'actine est le complexe Arp2/3 qui se compose des protéines Arp2 et Arp3 ainsi que de 5 sous-unités additionnelles ARPC1-5 (Campellone KG and Welch MD, 2010). Le complexe Arp2/3 se lie aux filaments d'actine préexistants et permet la nucléation de nouveaux filaments, grâce à ses sous-unités Arp2 et Arp3 qui miment un dimère d'actine G. Ces filaments se forment selon un angle de 70° avec les filaments préexistants et permettent ainsi de créer un réseau hautement ramifié (Fig. 15). Pour fonctionner, Arp2/3 doit être activé par des protéines de type NPFs (Nucleation Promoting Factors) tels que WASP, N-WASP, WAVE/Scar et WHAMM (Derivery E and Gautreau A, 2010). Ces facteurs possèdent un domaine VCA leur permettant à la fois de lier les monomères d'actine G au niveau d'un sous domaine WH2 et d'activer le complexe Arp2/3 grâce à un autre sous domaine riche en acides aminés acides (CA) (Firat-Karalar and Welch, 2010).

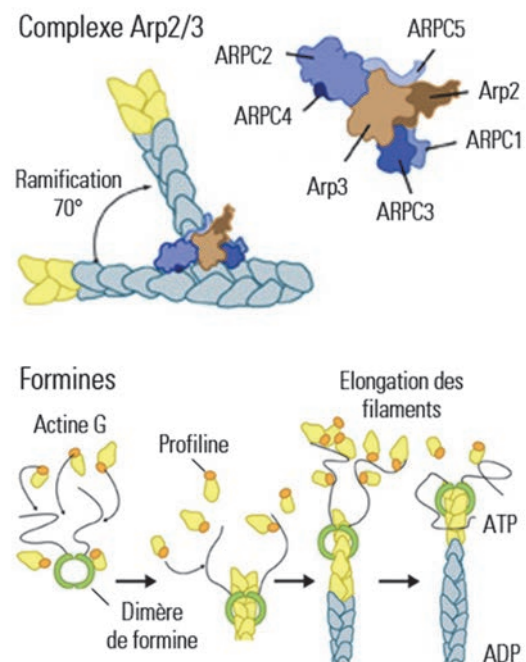


Figure 15 : Nucléation des filaments d'actine

Les facteurs de nucléation sont nécessaires à l'assemblage rapide et régulé des filaments d'actine. A titre d'exemples : le complexe Arp2/3, qui favorise la densification des réseaux en permettant la nucléation de nouveaux filaments à partir de filaments préexistants ; ou les formines, qui fonctionnent sous forme de dimère et permettent la formation *de novo* de nouveaux filaments non ramifiés. Adaptée de MBInfo, Mechano-biology Institute, Singapore.

Contrairement au complexe Arp2/3, les protéines de la famille des formines nucléent des filaments d'actine directement à partir des monomères d'actine G et permettent la formation de longs filaments non ramifiés (Chesarone et al, 2010). Les formines fonctionnent en dimère en s'associant au niveau de leurs domaines FH2 et accompagnent la croissance des filaments d'actine en restant associées au niveau de l'extrémité barbée (Fig. 15). *In vitro*, le domaine FH2 est suffisant pour l'activité de nucléation des formines (Kovar et al, 2006). Les formines possèdent également un domaine FH1,

qui, par son affinité pour l'actine G, permet d'augmenter la concentration locale de monomère et de favoriser la polymérisation des filaments. Chez les mammifères, les formines sont classées en deux grands groupes : les formines de type Diaphanous (DRFs, Diaphanous Related Formins) telles que mDia1, 2 et 3 ; et les formines de type FMNs (Founding Mammalian Formins) telles que FMN1 et FMN2. En plus de leurs domaines FH1 et FH2, les DRFs possèdent un domaine GBD leur permettant de lier et d'être régulées par les GTPases de type Rho (RhoA, Rac1 et Cdc42).

Les facteurs Spire1 et 2, Cordon Bleu (COBL), leiomodin (LMOD) (Qualmann B and Kessels MM, 2009) ; JMY (Zuchero et al JB, 2009) et APC (Okada K et al, 2010) ; peuvent être regroupés dans une même famille de nucléateurs possédant des sites de fixation aux monomères d'actine en tandem qui leur permettent de stabiliser des dimères d'actine G. Le plus souvent, ces sites de fixation sont des domaines de type WH2 que l'on retrouve notamment dans le complexe Arp2/3. Le mode de fonctionnement de cette nouvelle famille de nucléateurs est encore méconnu. Cependant, de nombreuses études ont pu montrer que ces facteurs fonctionnent en coopération avec d'autres nucléateurs. A titre d'exemple, les facteurs Spire 1 et 2 ainsi que APC sont connus pour favoriser la nucléation de l'actine en coopération avec des formines (Capuccino et mDia1) (Dahlgaard K et al, 2007 ; Okada K et al, 2010), tandis que JMY coopère quant à lui avec le complexe Arp2/3 (Zuchero et al, 2009).

b) Organisation des réseaux d'actine

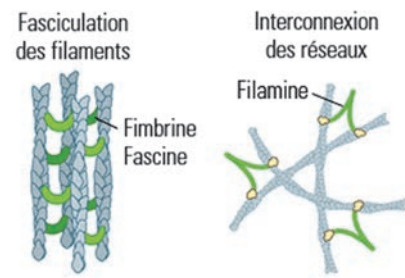
En dehors des nucléateurs, de nombreux facteurs permettent de réguler la mise en place et l'organisation des réseaux formés par les filaments d'actine. La profiline joue par exemple un rôle double et essentiel dans la plasticité des réseaux. En effet, cette protéine, qui possède une forte affinité pour l'actine G, favorise la séquestration d'une réserve cytoplasmique de monomères qui pourra, en cas de besoin, être rapidement mobilisée pour l'assemblage de nouvelles structures. Lorsque les conditions sont favorables, la profiline permet à l'inverse de potentialiser la polymérisation de nouveaux filaments, en catalysant d'une part la conversion de l'ADP des monomères en ATP, et en coopérant d'autre part avec des nucléateurs tels que les formines (Romero et al, 2004).

Une fois les réseaux assemblés, leur organisation est fortement influencée par l'action des facteurs de réticulation, ou « crosslinkers », qui permettent la formation de liens entre les filaments d'actine (Fig. 16). Certains de ces facteurs, tels que la fimbrine, la fascine ou dans certains cas l' α -actinine, agissent à de faibles distances (environ 10 nm) et favorisent l'assemblage de faisceaux condensés de filaments parallèles ou antiparallèles (actine fasciculée) (Vignjevic et al, 2003 ; Skau et

al, 2011 ; Sjöblom et al, 2008). D'autres facteurs, tels que la filamine ou l' α -actinine (dans d'autres cas), agissent à longue distance (supérieur à 100 nm) et autorisent quant à eux l'établissement de connexions entre des filaments parallèles (Stossel et al, 2001 ; Sjöblom et al, 2008). Ainsi, et en fonction de leur niveau d'organisation, les réseaux de filaments d'actine permettent la mise en place de différentes structures cellulaires. Lors de la migration cellulaire, la rigidité offerte par les faisceaux de filaments est par exemple nécessaire à la formation des filopodes, tandis que la ramification des réseaux est indispensable à la formation des lamellipodes. Ces deux structures agissent alors en coopération et permettent respectivement aux cellules de s'accrocher et de se mouvoir sur leur substrat (Le Clainche and Carlier, 2008 ; Blanchoin et al, 2014).

De nombreux facteurs permettent, pour leurs parts, de modifier la dynamique d'assemblage et de désassemblage des filaments. Le complexe CapZ se lie par exemple au niveau de l'extrémité barbée des filaments et s'oppose à l'incorporation de nouveaux monomères d'actine G (Sept D et al, 1999) (Fig. 16). La tropomoduline (Tmod) agit également de la sorte au niveau de l'extrémité pointue et permet ainsi, avec CapZ, de stabiliser localement des structures formées par le cytosquelette d'actine en s'opposant à l'élongation des filaments (Dos Remedios CG et al, 2003). A l'inverse, l'ADF/Cofiline agit en faveur de la dépolymérisation ou de la fragmentation des filaments (Carlier et al, 1997 ; Michelot A et al, 2007) (Fig. 16). L'affinité de l'ADF/Cofiline pour l'actine est plus forte pour les zones anciennes des filaments, caractérisées par des monomères liés à l'ADP, et permet ainsi le « recyclage » des réseaux (Blanchoin L and Pollard TD, 1999). Dans certains cas, la fragmentation des filaments par l'ADF/Cofiline aboutit à une augmentation du nombre d'extrémités disponibles et peut favoriser la densification du réseau. D'autres facteurs tels que la Gelsoline ou la Villine sont également capables de fragmenter les filaments d'actine (Robinson RC et al, 1999).

Facteurs de réticulations



Stabilisation/déstabilisation des filaments d'actine

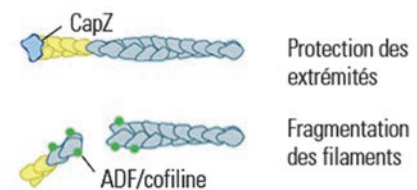


Figure 16 : Organisation des réseaux de filaments d'actine

De nombreux facteurs partenaires permettent de réguler l'organisation et la dynamique des réseaux d'actine au sein de la cellule. Les facteurs de réticulation sont par exemple responsables de l'agencement des réseaux, tandis que des protéines telles que CapZ ou l'ADF/cofiline permettent de modifier localement la stabilité des filaments. Adaptée de MBinfo, Mechano-biology Institute, Singapore.

c) Cortex cellulaire et filaments d'actine.

Le cortex cellulaire se présente sous la forme d'une fine couche sous-membranaire (de 20 à 250 nm d'épaisseur selon les cas) de filaments d'actine parallèles associés à différentes protéines partenaires (Morone et al, 2006 ; Charras et al, 2006). Ce réseau d'actine cortical entretient de manière permanente des interactions avec la membrane plasmique et joue de ce fait un rôle essentiel dans le contrôle de la morphologie cellulaire. Le cortex permet ainsi aux cellules de résister à des stress mécaniques externes ainsi qu'à leur propre pression osmotique interne (Salbreux et al, 2012 ; Stewart et al, 2011). Différentes études ont permis d'identifier les facteurs mDia1-2-3, FMN1 et le complexe Arp2/3 comme les principaux nucléateurs de cette sous-population corticale de filaments d'actine (Eisenmann et al, 2007 ; Han et al, 2009 ; Roh-Johnson et al, 2012). En plus de ces nucléateurs, différents partenaires dit « habituels » des filaments d'actine, tels que les facteurs de réticulation (filamine et α -actinine) ou encore les moteurs moléculaires de type myosine, se localisent dans la périphérie cellulaire et permettent de moduler l'organisation et la contractilité du cortex (Salbreux et al, 2012).

Pour que ces modifications s'appliquent à la membrane plasmique, cette dernière doit entretenir des interactions permanentes avec les filaments d'actine du cortex. Pour cela, la cellule dispose notamment d'un groupe de protéines adaptatrices, appelé les ERM (Ezrin Radixin Moesin), se composant d'une part d'un domaine N-terminal FERM liant la membrane plasmique et d'autre part d'un domaine C-terminal C-ERMAD liant les filaments d'actine (Fehon et al, 2010) (Fig. 17). Avant de pouvoir remplir leur rôle, les ERM doivent être activés par phosphorylation selon un modèle à deux étapes. En effet, de manière constitutive, les ERM se présentent sous une forme repliée, empêchant leur fonctionnement (Gary and Bretscher, 1995). Cette conformation est le résultat d'une interaction intramoléculaire entre les domaines FERM et C-ERMAD, qui ne peut être empêchée que par la phosphorylation d'un résidu thréonine conservé entre les trois ERM. Pour cela, les ERM repliés sont recrutés au niveau des régions membranaires riches en phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (ptdIns(4,5)p2 ou PIP2), où ils sont mis en contact avec différentes kinases capables de

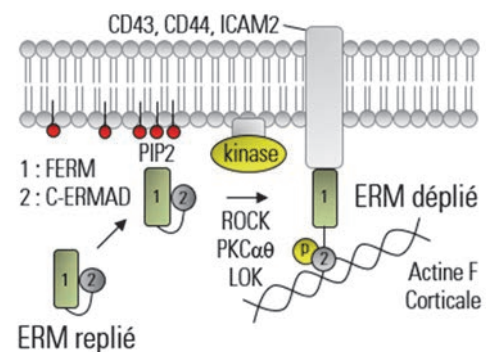


Figure 17 : ERM (Ezrin Radixin Moesin)

Les ERM sont des protéines adaptatrices permettant de relier la membrane plasmique aux filaments d'actine composant le cortex cellulaire. Pour cela, les ERM doivent être recrutés à la membrane par le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) et subir une phosphorylation leur permettant de se déplier. Dans cette conformation, le domaine FERM des ERM peut interagir avec différentes protéines membranaires et le domaine C-ERMAD avec les filaments d'actine corticaux.

les phosphoryler (Yonemura et al, 2002 ; Fievet et al, 2004). Différentes études ont permis de mettre en évidence le rôle des kinases ROCKs, PKC α et θ ou encore LOK dans ce processus (Matsui et al, 1998 ; Ng et al, 2001 ; Belkina et al, 2009). Une fois dépliés, les ERM s sont alors en mesure de relier les filaments d'actine du cortex avec la membrane plasmique. Il est important de noter que les ERM s sont capables de lier directement les filaments d'actine, via leur domaine C-ERMAD, tandis que leur interaction avec la membrane plasmique nécessite l'intermédiaire de protéines membranaires (e.g. CD43 et CD44 ou encore ICAM2) reconnues par le domaine FERM (Yonemura et al, 1998 ; Fehon et al, 2010).

2. Contraction des réseaux d'actine par la myosine

A l'image de moteurs moléculaires agissant sur les microtubules, tels que la kinésine ou la dynéine, les myosines permettent de contracter les réseaux de filaments d'actine en utilisant l'énergie dérivée de cycles répétés d'hydrolyse de l'ATP. L'action des myosines a été pour la première fois mise en évidence lors de la contraction des cellules musculaires. Depuis, de nombreuses isoformes de ces moteurs moléculaires ont pu être identifiées. Parmi les différentes familles de myosines, seules les myosines de type 2, dites conventionnelles, participent réellement à la contraction des filaments d'actine. Ce type de myosine agit au niveau des cellules musculaires (striées, lisses, cardiaques) mais également dans les cellules non musculaires. Les autres myosines, dites par opposition non-conventionnelles, interviennent dans d'autres processus tels que l'organisation des filaments d'actine au niveau du cortex (myosine 1) ou encore le transport de vésicules, d'organites ou d'ARN m le long de ces filaments (myosine 5). Nous nous intéresserons ici à la myosine 2 de type non musculaire NMY2 (que nous appellerons simplement myosine 2), qui participe à la contraction des filaments d'actine lors d'évènements tels que la division ou la migration cellulaire.

a) Structure de la myosine 2.

La myosine 2 fonctionnelle résulte de l'assemblage de trois paires de peptides (hexamère) s'articulant autour de l'association de deux chaînes lourdes (230 kDa) auxquelles viennent s'ajouter : deux chaînes légères (20 kDa) et deux chaînes essentielles (17 kDa) permettant de réguler l'activité contractile du moteur moléculaire (Fig. 18). Dans la région N-terminale de chacune des deux chaînes lourdes se situe un domaine globulaire comprenant le site de fixation à l'actine et le site de fixation du nucléotide (ATP ou ADP). Cette région, plus communément appelée « tête » de la myosine,

est reliée au reste du complexe par une région intermédiaire ou « cou », comprenant les chaînes régulatrices et essentielles associées. Cette région intermédiaire, confère une flexibilité à la myosine 2 lui permettant par un phénomène de « bras de levier », de convertir l'énergie chimique produite par l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique (Vicente-Manzanares et al, 2009). La région C-terminale des chaînes lourdes permet, quant à elle, la liaison de nombreuses protéines régulatrices et est nécessaire à la formation des mini-filaments de myosine 2. Les mini-filaments, résultant de l'association « tête-bêche » de deux hexamères, constituent les unités contractiles efficaces de ce moteur moléculaire (Mahajan et al, 1996 ; Levayer and Lecuit, 2012) (Fig. 18). Chez les mammifères, il existe trois isoformes différentes de la chaîne lourde (de type A, B ou C) chacune codée par son propre gène. En fonction de la nature de cette isoforme, qui s'assemble uniquement sous la forme d'homodimère, l'hexamère de myosine 2, alors de type A, B ou C, possède différentes caractéristiques. Ainsi, la myosine 2 de type A présente une plus forte contractilité, alors que la myosine de type B se caractérise par une plus grande affinité pour les filaments d'actine (Kovac et al, 2003 ; Wang et al, 2003).

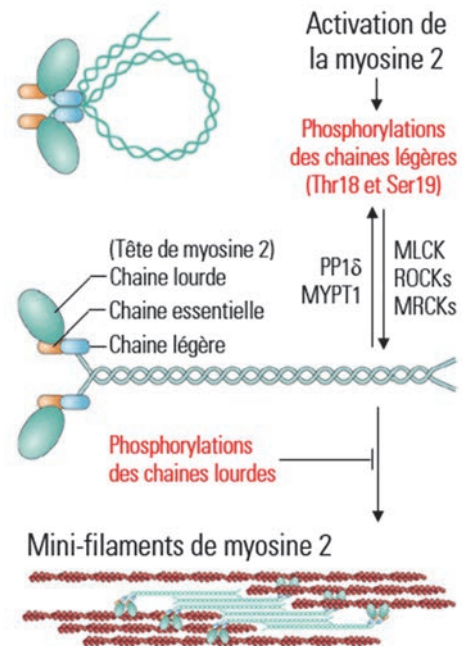


Figure 18 : Régulation de la myosine 2

La phosphorylation des résidus Thr18 et Ser19 des chaînes légères de la myosine 2 favorise le dépliement et l'activation du moteur moléculaire. Les capacités contractiles de la myosine 2 peuvent être augmentées par l'association « tête bêche » des hexamères et la formation des mini-filaments. Adaptée de Vicente-Manzanares et al, 2009.

b) Régulation de l'activité contractile de la myosine 2.

Comme de nombreuses protéines, l'activité de la myosine 2 peut être modulée par phosphorylation. Deux résidus se situant sur les chaînes légères, la Thr18 et la Ser19 (cas des mammifères), sont notamment déterminants dans la régulation des capacités contractiles de la myosine 2 (Fig. 18). En effet, la phosphorylation de ces résidus par des kinases telles que MLCK, ROCKs ou encore MRCKs, est nécessaire à un dépliement des hexamères leur permettant d'interagir avec les filaments d'actine (Matsumura, 2005). De plus, la phosphorylation de ces résidus a pour conséquence d'accroître l'activité ATPase de la tête de myosine 2 et d'augmenter de ce fait la fréquence des changements conformationnels de la région intermédiaire (Craig et al, 1983 ; Ikebe et al, 1986). À l'inverse des kinases précédemment citées, le complexe formé par la phosphatase PP1δ et la sous-

unité non catalytique MYPT1 permet quant à lui d'inhiber, par déphosphorylation des résidus Thr18 et la Ser19, l'activité contractile du moteur moléculaire (Matsumura and Hartshorne, 2007). De ce fait, et dans de nombreux cas, l'activité contractile de la myosine 2 dépend d'une balance entre une activité kinase et l'activité phosphatase PP1 δ /MYPT1. A noter que certaines kinases, comme ROCK, sont en mesure d'agir à deux niveaux, en phosphorylant la myosine 2 d'une part, et en inhibant le complexe phosphatase PP1 δ /MYPT1 d'autre part (par phosphorylation de la sous-unité MYPT1) (Kawano et al, 1999).

La phosphorylation des chaînes lourdes joue également un rôle important dans la régulation de l'activité contractile de la myosine 2. En effet, différentes sérines localisées dans la région C-terminale des chaînes lourdes sont la cible de kinases telles que PKC ou CKII (Murakami et al, 1998). Dans la majorité des cas étudiés, la phosphorylation des chaînes lourdes s'oppose à l'assemblage ou à la persistance des mini-filaments fortement contractiles de myosine 2 (Vicente-Manzanares et al, 2009 ; Levayer and Lecuit, 2012) (Fig. 18).

3. Régulation de l'acto-myosine par les Rho GTPases.

Les GTPases de la famille Rho telles que RhoA, Rac1 et Cdc42 sont connues pour participer à l'organisation du cytosquelette d'acto-myosine dans de nombreux contextes cellulaires. Le fonctionnement de ces protéines dépend de leur capacité à hydrolyser le GTP et à alterner entre une forme active (liée au GTP) et une forme inactive (liée au GDP). Différents facteurs d'échanges permettent d'accélérer ce processus et d'augmenter ainsi l'activité des Rho GTPases (Fig. 19). C'est le cas des GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factor) qui favorisent le chargement du GTP, ou des GAPs (GTPase Activating Protein) qui accélèrent le phénomène d'hydrolyse du GTP. A l'inverse, d'autres facteurs tels que les GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor) s'opposent à cette activité en inhibant le relargage du GDP et en séquestrant les GTPases (Cherfils and Zeghouf, 2013). En cas d'activation, les Rho GTPases sont en mesure

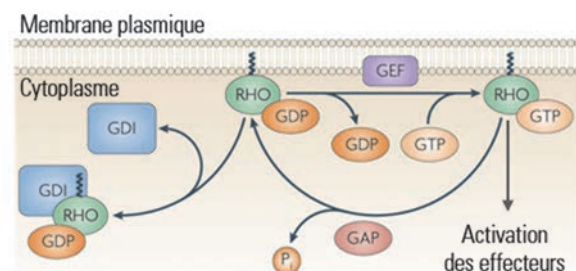


Figure 19 : Cycle d'activation des Rho GTPases

En hydrolysant de manière cyclique le GTP en GDP, les Rho GTPases permettent l'activation de nombreuses voies de signalisation cellulaire participant notamment à l'organisation du cytosquelette d'acto-myosine. Différents facteurs partenaires, tels que les GEFs ou les GAPs, favorisent le processus d'hydrolyse et potentialisent l'activation des Rho GTPases. D'autres facteurs, en revanche, inhibent la dissociation du GDP et s'opposent de ce fait à leur activation. Adaptée de Tybulewicz et al, 2009.

d'induire une série d'évènements moléculaires pouvant conduire à de profondes réorganisations de l'architecture cellulaire. Différentes drogues, sondes fluorescentes spécifiques (reconnaissant les GTPases actives liées au GTP) ainsi que la surexpression de formes inactives (dominants négatifs) ont permis de mieux comprendre leur fonctionnement *in vivo*. Nous nous intéresserons ici aux différents effecteurs des Rho GTPases ayant une influence sur l'assemblage, l'organisation et la dynamique des réseaux d'acto-myosine, et nous aborderons plus en détail l'influence de ces GTPases lors de la division cellulaire.

a) Effecteurs des Rho GTPases

Les Rho GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 sont, de par leurs capacités à induire la nucléation des filaments d'actine et à activer la myosine 2, toutes les trois capables de modifier l'organisation et la dynamique des réseaux d'acto-myosine (Fig. 20). Lors de l'interphase, l'activité de RhoA est nécessaire à la formation des fibres de stress, qui résultent d'un assemblage en faisceaux de plusieurs filaments d'actine, tandis que Rac1 et Cdc42 sont notamment associées respectivement à la formation des lamellipodes et des filopodes.

La nucléation de nouveaux filaments d'actine par les Rho GTPases s'opère via le recrutement de nucléateurs tels que les formines de types Diaphanous (DRFs, Diaphanous Related Formins) (filaments non ramifiés), ou le complexe Arp2/3 (filaments ramifiés). Dans la majorité des cas, l'activation des DRFs (mDia1, 2 et 3) dépend de la GTPase RhoA, avec cependant différents exemples de régulation de mDia2 et 3 par Rac1 et Cdc42 (Lammers et al, 2008). L'activation de ce type de formine nécessite la liaison des Rho GTPases au niveau d'un domaine GBD situé à l'extrémité N-terminale du nucléateur. En se fixant de la sorte, les Rho GTPases autorisent, en effet, un dépliement des formines, qui

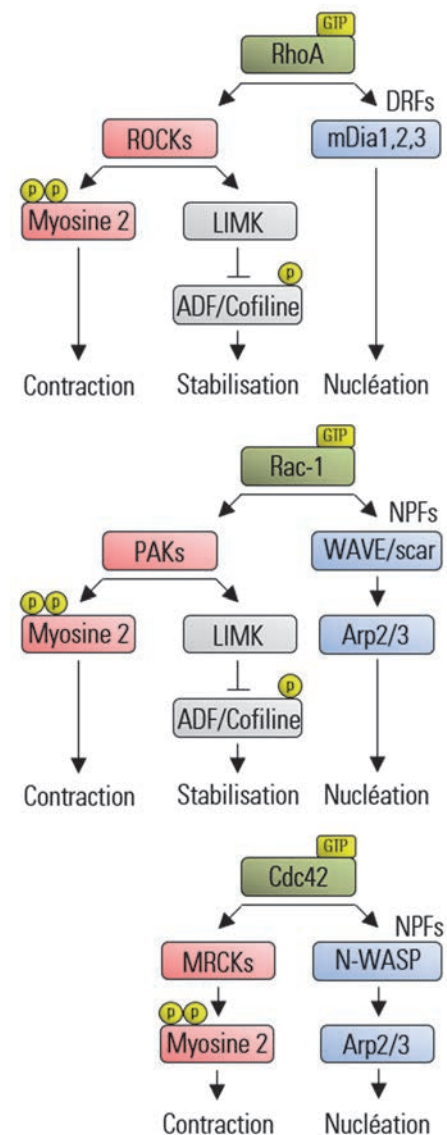


Figure 20 : Régulation des réseaux de filaments d'actine par les Rho GTPases
L'activation de chacune des Rho GTPases RhoA, Rac-1 et Cdc42 permet de modifier l'organisation et la dynamique des réseaux de filaments d'actine. Ainsi, les Rho GTPases ont notamment une influence sur : la formation de nouveaux filaments en activant des nucléateurs, la stabilité de ces derniers en inhibant l'ADF/cofiline et enfin sur la contractilité des réseaux en activant la myosine 2.

aura pour conséquence d'exposer leurs domaines FH1 et FH2 et de permettre ainsi leur activité nucléatrice (Rose et al, 2005 ; Otomo et al, 2005). L'autre voie de nucléation, impliquant le complexe Arp2/3, intervient quant à elle uniquement en aval de Rac1 et Cdc42 et nécessite l'activation intermédiaire de facteurs de type NPFs au niveau du cortex cellulaire (par exemple : WASP, N-WASP, WAVE/Scar...). Comme pour les formines, l'interaction des GTPases avec les NPFs va permettre, par changement conformationnel, de rendre accessible un domaine (WCA), favorisant le recrutement et l'activité nucléatrice du complexe Arp2/3. En fonction de leur type, les NPFs semblent être favorablement activés par Rac1 ou Cdc42. A titre d'exemple, l'activation de WASP et de N-WASP dépend de la fixation de Cdc42 au niveau d'un domaine CRIB (Cdc42 Rac1 Interactive Binding), tandis que l'activation de WAVE/scar requiert la fixation de Rac1 associé à différents partenaires (Derivery E and Gautreau A, 2010 ; Firat-Karalar and Welch, 2010).

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activité de la myosine 2 repose sur l'état de phosphorylation de deux résidus conservés présents sur les chaînes légères du moteur moléculaire (Thr18 et la Ser19). Chacune des Rho GTPases, via l'activation de kinases spécifiques, est en mesure d'induire ce type de phosphorylation et permettent ainsi de moduler localement la contractilité des réseaux d'acto-myosine. Respectivement et de manière non exhaustive, les GTPases RhoA, Rac-1 et Cdc42 favorisent l'activation de la myosine 2 via des kinases de type ROCKs, PAKs et MRCKs (Sit and Manser, 2011 ; Spiering and Hodgson, 2011). En plus de leur rôle concernant la myosine, les kinases ROCKs et PAKs, permettent également de modifier la dynamique des réseaux d'acto-myosine. En effet, ces deux kinases s'opposent à l'activité de l'ADF/Cofiline et favorisent ainsi la stabilité des filaments d'actine. Pour cela, ROCKs et PAKs activent un autre groupe de kinases, les LIMKs, par phosphorylation. Ces dernières ciblent alors l'ADF/Cofiline et interdisent son activité déstabilisatrice au moyen d'une phosphorylation inhibitrice (Bernard, 2007).

b) Rho GTPases et division cellulaire.

Chez les mammifères, RhoA appartient à un sous-groupe de trois GTPases : RhoA, B, C ; ayant chacune des rôles distincts au sein de la cellule (Heasman SJ and Ridley AJ, 2008). Cependant, et certainement en raison d'une redondance fonctionnelle entre RhoB et RhoC, seule l'inactivation génétique de RhoA est létale chez la souris (Liu et al, 2001 ; Hakem et al, 2005). Ceci s'explique notamment par le rôle essentiel et conservé qu'entretient RhoA lors de la division cellulaire. RhoA est en effet nécessaire, via l'activation des formines de type mDia et des kinases ROCKs, à l'assemblage et à la contraction de l'anneau de cytotérière permettant de séparer les cellules filles (Piekny A et al,

2005). Dans ce contexte, l'activation localisée de RhoA repose sur le recrutement du facteur d'échange (GEF), Ect-2, au niveau de la région centrale du fuseau de division. Le recrutement d'Ect-2 est, quant à lui, dépendant du cycle cellulaire et requiert la phosphorylation, par la kinase Plk1, de la sous-unité MgcRacGAP du complexe de la « centralspindlin », composé des protéines MKLP1 et MgcRacGAP (Yuce et al, 2005 ; Petronczki M et al, 2007) (Fig.21).

A l'inverse de RhoA, l'activation de Rac1 a clairement une influence négative sur la réussite du processus de division cellulaire. En effet, la surexpression d'une forme constitutivement active de cette GTPase a pour conséquence d'induire la formation de cellules multinucléées (Jordan and Canman, 2012). De plus, son inhibition par surexpression d'une forme dominante négative, par ARN interférence, ou encore par mutation, n'empêche pas la division cellulaire (Yoshizaki et al, 2004 ; D'Avino et al, 2004 ; Canman et al, 2008). L'utilisation d'une sonde FRET, spécifique de la forme active de Rac1 (Rac1GTP), a permis de démontrer que l'activité de la GTPase est fortement réprimée dans la région du fuseau central (Yoshizaki et al, 2003). Cette inhibition est due à l'activité GAP de la sous-unité MgcRacGAP du complexe de la « centralspindlin », et s'oppose à la nucléation de filaments d'actine pouvant perturber l'assemblage de l'anneau de cytotérière (Canman et al, 2008 ; D'Avino and Glover, 2009) (Fig. 21). En effet, comme nous l'avons vu précédemment, sous sa forme active, Rac1 peut induire l'assemblage des filaments d'actine en activant Arp2/3 via l'activation des facteurs de type NPFs (WAVE/scar).

Comme pour Rac1, la déplétion ou l'inhibition de Cdc42 ne bloque pas la division cellulaire tandis que sa surexpression sous une forme constitutivement active entraîne la formation de cellules multinucléées (Jordan and Canman, 2012). Ce type d'expériences semble donc indiquer que l'activation Cdc42 possède une influence négative sur les processus mitotiques. Cependant, différentes études ont permis de mettre en évidence un rôle actif de Cdc42 favorisant, au contraire, le bon déroulement

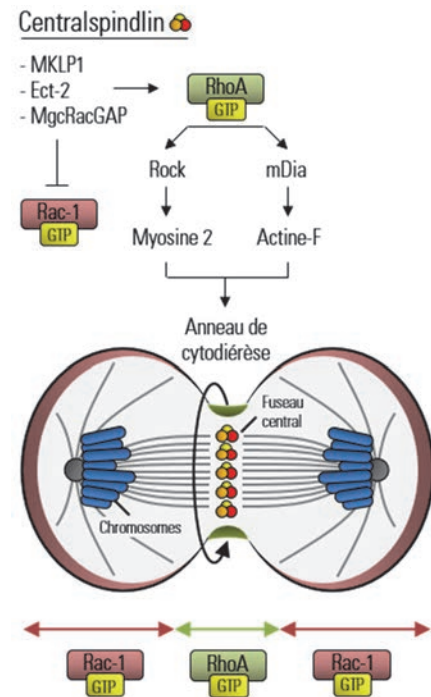


Figure 21 : Rôle des GTPases lors de la division cellulaire

Lors de l'anaphase, le complexe de la « centralspindlin » s'assemble au niveau de la région centrale du fuseau et régule localement l'activité des Rho GTPases. Les sous-unités Ect-2 et MgcRacGAP du complexe permettent respectivement d'activer RhoA et d'inhiber Rac-1. L'activation de RhoA est nécessaire à la mise en place de l'anneau de cytotérière, tandis que l'inhibition de Rac-1 permet de prévenir l'assemblage de filaments d'actine pouvant perturber le processus de constriction.

de ces processus. En effet, lors de la division des cellules épithéliales, l'activation de Cdc42 permet, en régulant le positionnement du fuseau mitotique, de garantir l'orientation de l'axe apico-basal des cellules constituant les tissus (Jaffe et al, 2008). Ce rôle de Cdc42 s'explique par son action en faveur de l'établissement d'une sous-population corticale d'actine, elle-même nécessaire à l'ancrage des microtubules, permettant ainsi d'orienter le fuseau mitotique (Mitsushima et al, 2009 ; Pearson and Bloom, 2004). De plus, en cas de déplétion de Cdc42, les cellules connaissent un ralentissement de la division cellulaire coïncidant avec un défaut d'alignement des chromosomes (Yasuda et al, 2006). L'activation, par Cdc42, de la formine mDia3 qui est responsable de l'interaction et de la bonne orientation des microtubules avec les kinetochores, pourrait en être la cause (Yasuda et al, 2004). Mis bout à bout, ces résultats ne permettent pas d'établir clairement le caractère essentiel ou non de l'activité de Cdc42 lors de la division cellulaire. D'autres études seront donc nécessaires pour clarifier le rôle de cette GTPase au cours de ce processus.

C. Modèles de division asymétrique

La division asymétrique est un mécanisme permettant de promouvoir une diversification des types cellulaires en s'appuyant sur une transmission inégale de déterminants moléculaires (ARNm, protéines). Les cellules filles, issues de ce type de division, connaissent alors un destin divergent et différent le plus souvent d'un point de vue fonctionnel et morphologique. Comme nous l'avons vu précédemment, la division asymétrique est un processus indispensable à l'émission des globules polaires de l'ovocyte, mais permet également l'auto-renouvellement des cellules souches et la mise en place des différents lignages cellulaires au cours du développement. D'une manière générale, le succès de ce processus repose sur l'établissement d'une polarisation cellulaire, permettant de définir deux sous-régions opposées et biochimiquement distinctes au sein de la cellule mère. Lors de la division, cette même polarisation permet d'orienter le fuseau mitotique (ou méiotique) et de positionner le plan de scission à l'interface des deux pôles cellulaires. Nous aborderons ici les mécanismes à l'origine de cette polarité et verrons en quoi cette dernière influence l'orientation du fuseau lors de la division. Pour cela, nous détaillerons les mécanismes se déroulant au sein de différents modèles de division asymétrique : la prolifération des levures *Saccharomyces cerevisiae*, la division du neuroblaste de *Drosophila melanogaster* et la première division mitotique du zygote de *Caenorhabditis elegans*.

1. Mécanismes généraux

L'établissement d'une polarité cellulaire est un processus fondamental permettant aux cellules d'acquérir les caractéristiques nécessaires à leurs fonctions. Ainsi, la polarisation apico-basale des cellules épithéliales permet de séparer des compartiments au sein des organismes, tandis que la mise en place d'un front de migration dans les cellules mésenchymateuses est à l'origine de leurs déplacements. Lors de la division asymétrique, la polarisation de la cellule mère intervient avant la division et peut s'effectuer de manière spontanée ou en réponse à des stimuli internes/externes. Dans la majorité des cas, cette polarisation requiert l'amplification d'une brisure de symétrie initiale par un système de rétro-contrôle positif (auto-amplification) et un antagonisme entre les déterminants moléculaires polarisés (Thompson, 2013).

Lors de la division, l'alignement du fuseau mitotique avec l'axe de polarisation permet, quant à lui, de garantir la répartition asymétrique des déterminants de l'identité cellulaire. L'orientation du

fuseau est, en effet, déterminante pour le positionnement du plan de cytodierèse et joue de ce fait un rôle fondamental lors des processus de divisions asymétriques. D'une manière générale, l'assemblage du fuseau intervient suite à la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD), et s'opère à partir de microtubules émis depuis les centrosomes. Le fuseau se compose alors de trois types distincts de microtubules : les microtubules kinétochoriens, qui se lient aux chromosomes, les microtubules interpolaire, qui favorisent la formation du sillon de division, et enfin les microtubules astraux, qui permettent modifier l'orientation et le positionnement du fuseau mitotique (Glotzer, 2009 ; Tanaka, 2010).

L'influence des microtubules astraux sur l'orientation du fuseau mitotique dépend de leur capacité à entretenir des interactions dynamiques avec le cortex cellulaire. Cette capacité, repose sur un mécanisme de « recherche et capture », permettant aux microtubules d'explorer leur environnement, suite à des phénomènes de polymérisation et dépolymérisation successifs. Une fois capturés par le cortex, les microtubules astraux subissent alors des forces de tractions capables de modifier l'orientation et le positionnement du fuseau mitotique. L'origine de ces forces, qui s'exercent depuis la périphérie cellulaire, peut être multiple et provenir, par exemple, d'une dépolymérisation polarisée des microtubules (extrémité moins, au niveau du centrosome), de la contractions des réseaux d'actomyosine ou encore de l'action de moteurs moléculaires tels que la dynéine (Siller and Doe, 2009).

2. Prolifération de la levure *S.cerevisiae*

a) Polarisation cellulaire

La prolifération mitotique de *S.cerevisiae* s'effectue par division asymétrique et s'initie à l'issue de la transition G1-S du cycle cellulaire. Elle se caractérise par le bourgeonnement d'une cellule fille de petite taille qui, pour garantir la pérennité de la population, héritera de la majorité des composants nouvellement synthétisés par la cellule mère (Macara and Mili, 2008). La formation du bourgeon a le plus souvent lieu à proximité de la cicatrice résultant de la division précédente, mais peut également intervenir de manière spontanée (Irazoqui et al, 2003). Dans les deux cas, la cellule subit une brisure de symétrie et se polarise progressivement (Fig. 22). La réorganisation du cytosquelette d'actine constitue l'un des évènements notables de polarisation et permet de relier le bourgeon à la cellule mère par l'intermédiaire de filaments cytoplasmiques. Ces filaments agissent comme des « câbles » de transport et favorisent l'acheminement des ressources maternelles nécessaires à la croissance du bourgeon (Li, 2013). Le criblage de mutants présentant un défaut de

division cellulaire a permis d'identifier la GTPase Cdc42 comme l'un des principaux régulateur de la polarisation de *S.cerevisiae* (Adams et al, 1990). En effet, l'absence de cette GTPase se traduit par une incapacité des levures à bourgeonner et par un accroissement isotropique de la cellule mère.

En conditions normales, les levures disposent de deux voies complémentaires pour établir la polarisation de Cdc42. La première d'entre elles, repose sur la mise en place d'un phénomène d'auto-amplification entre la GTPase et les câbles de filaments d'actine cytoplasmiques (Karpova et al, 2000 ; Moseley and Goode, 2006). Selon ce phénomène, Cdc42 est nécessaire à l'assemblage initial des câbles, tandis que ces derniers favorisent, en retour, la polarisation de la GTPase en l'acheminant de manière sélective au niveau du bourgeon (Wedlich-Soldner et al, 2003, 2004 ; Pruyne et al, 2004 ; Irazoqui et al, 2005). L'utilisation de drogues inhibant la polymérisation des filaments d'actine (latrunculine A ou B) révèle cependant, que ce processus d'auto-amplification n'explique pas, à lui seul, la polarisation pré-mitotique de *S.cerevisiae* (Ayscough et al, 1997 ; Irazoqui et al, 2005). En effet, différentes études ont mis en évidence l'existence d'une voie de polarisation parallèle faisant intervenir le complexe formé par la protéine adaptatrice Bem1, la kinase Cla4 et l'activateur de Cdc42 : le facteur d'échange (GEF) Cdc24 (Bender and Pringle, 1991 ; Chant et al, 1991 ; Bose et al, 2001). Cette deuxième voie fonctionne également par auto-amplification, selon une boucle impliquant le recrutement du complexe Bem1/Cla4/Cdc24 par Cdc42 et l'activation consécutive de Cdc42 par Cdc24 (Gulli et al, 2000 ; Butty et al, 2002). A l'image des expériences de dépolymérisation des filaments d'actine, la déplétion de la protéine Bem1 ($\Delta bem1$), ne permet pas, à elle seule, d'inhiber la polarité cellulaire de *S.cerevisiae* (Chenevert et al, 1992). Une telle inhibition requiert les effets combinés de la déplétion de Bem1 et de la dépolymérisation des filaments d'actine (Wedlich-Soldner et al, 2004). L'ensemble de ces résultats suggère donc que ces deux voies de polarisation agissent de manière indépendante. Cependant, la mise en place de simulations numériques a permis de fournir une explication possible quant à cette apparente redondance fonctionnelle (Brandman et al, 2005). Selon ce nouveau modèle, le complexe Bem1/Cla4/Cdc24 et les câbles de filaments d'actine agissent en coopération et ont respectivement un rôle prépondérant dans l'initiation et le maintien de la polarisation de Cdc42.

b) Positionnement du fuseau

Lors de la division asymétrique de *S.cerevisiae*, l'alignement du fuseau avec l'axe de la polarisation cellulaire, repose sur l'acheminement sélectif de l'un des deux centrosomes (Spindle Pole Body ou SPB chez la levure) vers le bourgeon en cours de formation (Fig. 22). Cette relocalisation

s'opère par le transport polarisé de l'extrémité plus des microtubules astraux, le long des câbles cytoplasmiques de filaments d'actine (Miller et al, 2006). Ce processus est dépendant de l'activité du moteur moléculaire Myo2, et requiert l'intervention du complexe Kar9/Bim1. Ce dernier permet, en effet, de faire le lien entre les microtubules et le moteur moléculaire, et se localise uniquement au niveau du SPB de la cellule fille (Hwang et al, 2003 ; Liakopoulos et al, 2003 ; Grava et al, 2006). A l'issue de cette relocalisation, l'orientation du fuseau est verrouillée par la capture et le raccourcissement des microtubules à proximité du bourgeon. Ce phénomène d'ancrage des microtubules est dépendant du facteur Bud6, cependant le mode d'action de cette protéine est encore inconnu (Adames et al, 2000 ; Kusch et al, 2002 ; Huisman et al, 2004).

A l'issue de l'anaphase, le fuseau connaît un mouvement de translocation permettant de transférer le SPB de la cellule fille vers l'extrémité du bourgeon (Fig. 22). Ce processus est dépendant de l'activité d'un complexe dynéine-dynactine dont l'activité motrice, portée par la dynéine, est dirigée vers l'extrémité moins des microtubules (Carminati and Stearns, 1997). Dans un premier temps, ce complexe doit être transporté, sous une forme inactive, vers l'extrémité plus des microtubules astraux. Ce transport est assuré par l'action d'un autre moteur moléculaire, la kinésine Kip2, fonctionnant en coopération avec les facteurs Bik1, Pac1 et Ndl1 (Lee et al, 2003 ; Sheeman et al, 2003). Une fois au cortex cellulaire, le complexe dynéine-dynactine est activé par la protéine Num1, et exerce alors les forces de tractions nécessaires au repositionnement du fuseau (Heil-Chapelaine et al, 2000 ;

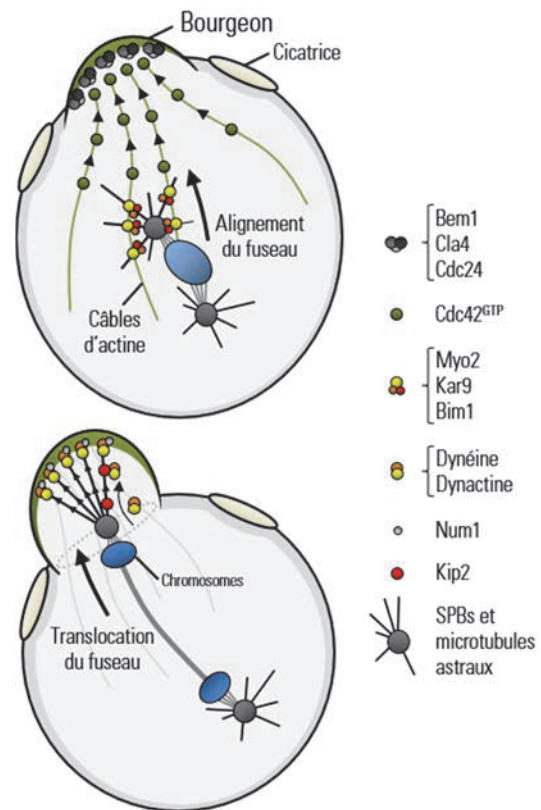


Figure 22 : Division asymétrique de *S.cerevisiae*

La croissance du bourgeon repose sur la mise en place de câbles cytoplasmiques d'actine entre la cellule fille et la cellule mère. L'assemblage de ces câbles est favorisé par la polarisation de la GTPase Cdc42 et du complexe Bem1/Cla4/Cdc24. Les câbles d'actine permettent l'acheminement des ressources maternelles (protéine, ARNm...) et sont également nécessaires à la migration du centrosome (SPB) du bourgeon. Cette migration requiert l'action de Myo2, qui se lie aux microtubules astraux du SPB par l'intermédiaire du complexe Kar9/Bim1. En fin de mitose, le fuseau connaît un mouvement de translocation permettant de transférer la moitié des chromosomes vers le bourgeon. Ce mouvement est le résultat de forces exercées sur les microtubules astraux par de la dynéine localisée au cortex. Dans ce contexte, la kinésine Kip2 et le facteur Num1 sont respectivement nécessaires au transport et à l'activation de la dynéine.

Farkasovsky and Kuntzel, 2001 ; Sheeman et al, 2003). L'inactivation génétique de la dynéine, de la dynactine ou encore de la protéine Num1 entraîne toutes trois des défauts de relocalisation du fuseau aboutissant à la formation d'une cellule mère binucléée et d'une cellule fille anucléée (Eshel et al, 1993 ; Li et al, 1993 ; Adames et al, 2000 ; Farkasovsky and Kuntzel, 2001).

3. Division du neuroblaste de *D.melanogaster*

a) Polarisation cellulaire

Lors du développement précoce, les neuroblastes de *D.melanogaster* se divisent à de multiples reprises pour donner naissance aux neurones qui peupleront le système nerveux central de l'embryon. A l'image des cellules souches, le potentiel prolifératif des neuroblastes repose sur leurs capacités à se répliquer tout en produisant les cellules progénitrices nécessaires à la formation des neurones (appelées GMC). Ce processus de prolifération est rendu possible par la polarisation apico-basale des neuroblastes et le caractère asymétrique de leurs divisions (Fig. 23). Ainsi, le pôle apical des neuroblastes formera un autre neuroblaste tandis que leur pôle basal sera à l'origine d'un progéniteur GMC. Les neuroblastes entament leur processus de division en se délaminant du neurectoderme ventral (épithélium embryonnaire à l'origine du système nerveux) et en se positionnant au niveau de la surface basale de ce dernier. Bien que pouvant intervenir de manière spontanée, leur polarisation s'opère alors en fonction de l'axe apico-basal du neurectoderme (Siegrist and Doe, 2006), et repose sur la mise en place d'un antagonisme réciproque entre les déterminants permettant de définir le pôle apical et basal de la cellule.

L'acquisition d'un destin neuronal pour le progéniteur GMC requiert l'accumulation de différents déterminants cellulaires dans le pôle basal du neuroblaste. On retrouve parmi ces déterminants, le facteur de transcription Prospero (Pros) et le suppresseur de tumeur Brat qui participent chacun à la mise en place des caractéristiques neuronales et antiprolifératives du GMC (Doe et al, 1991 ; Li et al, 2000 ; Lee et al, 2006a ; Betschinger et al, 2006). Ces deux protéines ne possèdent pas la capacité de se lier directement au cortex et nécessitent pour cela l'intermédiaire de la protéine adaptatrice Miranda (Ikeshima-Kataoka et al, 1997 ; Shen et al, 1997). D'autre part, la formation du progéniteur GMC requiert une inhibition basale de la signalisation Notch, rendue possible par l'accumulation asymétrique de la protéine Numb (Schweisguth F, 2004 ; Lee et al, 2006b ; Wang et al, 2006). Contrairement à Pros et Brat, l'association de Numb au cortex cellulaire s'effectue le plus

souvent de manière autonome, à l'exception des stades précoces de la mitose, où l'action de son partenaire Pon (Partner Of Numb) peut être requise (Lu et al, 1998).

De ce fait, si la localisation basale de Numb et Miranda joue un rôle central dans l'établissement de la destinée du progéniteur GMC, on peut s'interroger quant à l'origine de la polarisation de ces facteurs. La réponse à cette question se trouve au niveau du pôle apical du neuroblaste, où l'accumulation asymétrique de la kinase aPKC s'oppose, par phosphorylation directe, à leur recrutement (Rolls et al, 2003 ; Smith et al, 2007 ; Atwood and Prehoda, 2009). Ainsi, les mutants aPKC présentent des défauts de polarisation et se caractérisent, notamment, par une relocalisation uniforme des déterminants du pôle basal, tout autour du cortex cellulaire (Lee et al, 2006c). La polarisation apicale d'aPKC repose, quant à elle, sur l'incorporation de la kinase au sein du complexe de polarité PAR (Partitioning defective). Ce complexe se compose des facteurs Par-3 (bazooka), Par-6 et aPKC, et est connu pour favoriser la polarisation corticale dans de nombreux contextes et modèles cellulaires (Goldstein and Macara, 2007 ; McCaffrey and Macara, 2009). L'assemblage de ce dernier s'initie suite à la relocalisation membranaire de Par-3 (Wu et al, 2007), et nécessite l'activité de la GTPase Cdc42 pour recruter Par-6 et aPKC (Atwood et al, 2007).

L'action du facteur basal Lgl est également nécessaire à l'établissement et au maintien de la polarité des neuroblastes. Ce facteur, entretient, en effet, une relation antagoniste avec aPKC, lui permettant de restreindre l'activité de la kinase au niveau du pôle

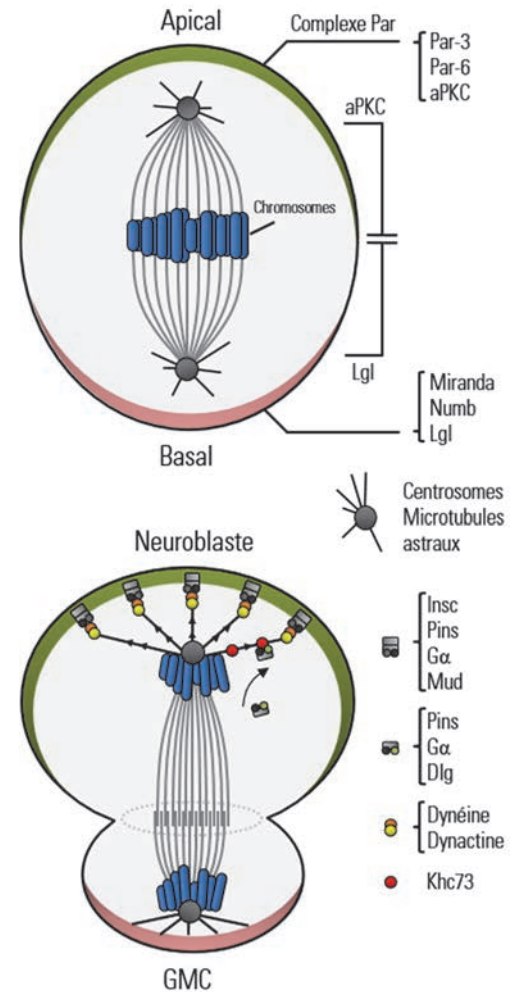


Figure 23 : Division asymétrique du neuroblaste de *D.melanogaster*

La polarisation du neuroblaste s'effectue en fonction de l'orientation du neuroectoderme et se caractérise par l'accumulation apicale du complexe Par (Par-3/Par-6/aPKC) et l'accumulation basale des facteurs Miranda, Numb et Lgl. L'établissement et le maintien de cette polarité sont favorisés par l'existence d'un antagonisme entre Lgl et aPKC. Lors de l'anaphase, le positionnement du fuseau repose sur la capture/traction des microtubules astraux par le complexe Pins/Gα/Mud. Pour ce faire, ce complexe s'associe, via le facteur Insc, à la sous-unité Par-3 du complexe Par. Une fois au cortex, la sous-unité Mud permet le recrutement de la dyneïne qui exerce alors les forces nécessaires pour déplacer le fuseau. En cas d'absence du complexe Par, un autre complexe, cette fois composé de Pins/Gα/Dlg et de la kinésine Khc73, permet de garantir le positionnement du fuseau et le bon déroulement de la division.

apical de la cellule (Lee et al, 2006c). A l'inverse, la phosphorylation de ce facteur par aPKC s'oppose au recrutement apical de ce dernier (Atwood and Prehoda, 2009). Ainsi, l'inactivation génétique de Lgl entraîne une relocalisation basale d'aPKC (Lee et al, 2006c), tandis que sa surexpression sous une forme non-phosphorylable (Lgl3A) favorise la dispersion apicale des facteurs de polarité basale (Atwood and Prehoda, 2009).

b) Positionnement du fuseau

Lors du premier cycle de division asymétrique, le fuseau du neuroblaste de *D.melanogaster* s'assemble de manière parallèle au neurectoderme et doit pivoter de 90° pour s'aligner avec l'axe de polarisation apico-basal de la cellule. Lors des cycles suivants, cette rotation n'est plus nécessaire car le centrosome, conservé par le neuroblaste, est maintenu au niveau du pôle apical durant l'interphase (Kaltschmidt et al, 2000). Cependant, le positionnement et l'orientation du fuseau doivent être régulés à chaque division et ce afin de garantir la ségrégation des déterminants cellulaires. Ce processus repose sur une disparité de taille entre les cellules filles et est rendu possible par l'asymétrisation du fuseau lors de l'anaphase. Les protéines Par, qui sont également responsables de la polarité cellulaire, jouent un rôle essentiel lors de ce processus. En effet, ces protéines, et plus particulièrement le complexe Par (Par-3/Par-6/aPKC), sont capables de modifier le positionnement du fuseau et font appel pour cela, à différents mécanismes semblant être conservés entre tous les métazoaires (Siller and Doe, 2009) (Fig. 23).

L'influence du complexe Par sur le positionnement du fuseau s'effectue par l'intermédiaire du facteur Insc (Inscuteable) (Kraut et al, 1996). Cette protéine permet, en effet, de relier la sous-unité Par-3 du complexe à un autre complexe membranaire composé des facteurs Pins (Partner of Inscuteable), Mud (NuMA chez les mammifères) et de la sous-unité G α de l'hétérotrimère de protéine G (Bowman et al, 2006 ; Izumi et al, 2006 ; Siller et al, 2006 ; Nipper et al, 2007). Ce deuxième complexe, via sa sous-unité Mud, favorise le recrutement cortical des dimères de dynéine/dynactine qui, comme chez *S.Cerevisiae*, permettent de modifier le positionnement du fuseau en tirant sur les microtubules astraux (Merdes et al, 1996 ; Siller and Doe, 2008). Dans ce système, seuls les facteurs de polarité apicale semblent influencer l'orientation du fuseau. En effet, l'inactivation génétique de Par-3 ou de Insc se traduit par le réalignement aléatoire du fuseau tandis que la perte des facteurs de polarité basale, tels que Numb ou Miranda, ne perturbe pas son orientation (Kraut et al, 1996 ; Shen et al, 1997 ; Wodarz et al, 1999 ; Siegrist and Doe, 2006). De manière intéressante une deuxième voie de positionnement du fuseau permet de garantir l'alignement du fuseau lors des stades tardifs de la

mitose (Siegrist and Doe, 2005) (Fig. 23). Cette dernière, fait appel au facteur Dlg (Disc Large) pour remplacer Mud au sein du complexe Pins/G α . Cet échange aura pour conséquence d'induire le recrutement de la kinésine Khc73, qui en retour favorisera la localisation corticale de Pins/G α . Le complexe Pins/G α /Khc73 ainsi formé, est capable de rétablir lors de la télophase, la polarité cellulaire et l'orientation du fuseau dans les neuroblastes mutants pour le facteur Insc. Cependant, les mécanismes responsables de ce sauvetage sont encore méconnus, et devront faire le cas d'études plus approfondies.

Plus récemment, différentes études sur le neuroblaste, ont mis en évidence l'existence d'un mécanisme alternatif de positionnement du sillon de division fonctionnant indépendamment du fuseau et des microtubules astraux. Celui-ci repose sur une accumulation basale de myosine 2 associée à différentes protéines connues pour participer à la formation de l'anneau de cytodièrese (anilline et Pavarotti/MKLP1). Ce mécanisme autorise la division asymétrique du neuroblaste, et ce, en absence de fuseau, normalement nécessaire à la stimulation équatoriale du sillon de division cellulaire (Cf. C.3.b Rho GTPases et division cellulaire). Ceci est d'autant plus remarquable dans des neuroblastes mutants pour les facteurs Mud ou Pins, au sein desquels le fuseau se relocalise de manière orthogonale à l'axe de polarisation apico-basale. En effet, dans ces conditions, la cellule présente une constriction en regard de la région centrale du fuseau et émet, simultanément, un petit lobe basal à l'emplacement initial du GMC (Cabernard et al, 2010). De manière surprenante, cette relocalisation asymétrique de la myosine 2 semble être indépendante des facteurs de polarité basale et requiert, à la place, la présence de Pins et G α (Cabernard et al, 2010 ; Connell et al, 2011). En plus de stimuler la division cellulaire, l'accumulation basale de la myosine 2 est nécessaire à la disparité de taille existant entre les cellules filles. En se contractant, cette dernière permet, en effet, de restreindre la taille du pôle basal (futur GMC) et semble favoriser, de ce fait, l'extension du cortex apical (futur neuroblaste) (Connell et al, 2011).

4. Division du zygote *C.elegans*

a) Polarisation cellulaire

Suite à la fécondation, le zygote (embryon monocellulaire) de *C.elegans* se polarise le long d'un axe antéro-postérieur et entame un processus de division asymétrique. Celui-ci aboutit à la formation d'une grande cellule antérieure (AB) et d'une petite cellule postérieure (P1). Chacune d'entre elles connaît un destin cellulaire différent et forme son propre lignage au cours du développement

(Rose and Gönczy, 2014). Dans ce contexte, la brisure initiale de symétrie intervient suite à la fécondation, par la formation du pôle postérieur de la cellule autour du centrosome apporté par le spermatozoïde (Cowan and Hyman, 2004).

A l'image de ce qui se déroule chez *S.cerevisiae*, la polarisation de l'embryon de *C.elegans* repose sur une réorganisation asymétrique du cytosquelette d'acto-myosine permettant le transport dirigé des facteurs de polarités. Dans le cas du zygote, cette réorganisation s'opère par la mise en place d'un flux cortical favorisant l'accumulation des filaments d'actine dans le pôle antérieur de la cellule (Hird and White, 1993 ; Munro et al, 2004 ; Cowan and Hyman, 2004) (Fig. 24). Ce phénomène s'explique par l'établissement d'un gradient antéro-postérieur de contractilité résultant d'une inactivation locale de la myosine 2 dans le pôle postérieur du zygote (Mayer et al, 2010). Cette inactivation est favorisée par l'accumulation, en postérieur, de la GAP Cyk-4 (MgcRacGAP chez les mammifères), connue pour inhiber la voie RhoA/Rock-1/myosine 2 dans de nombreux contextes cellulaires (Jenkins et al, 2006 ; Jantsch-Plunger et al, 2000). De ce fait, la forte concentration en Cyk-4 présente au sein du spermatozoïde permet de fournir une explication probable quant à l'origine de la brisure de symétrie produite par la fécondation (Jenkins et al, 2006).

Le criblage génétique de différents mutants présentant des défauts de polarisation a permis de mettre en évidence le rôle prépondérant des protéines Par-1 à 6 dans les processus de division asymétrique du zygote de *C.elegans* (Kemphues et al, 1988). Ces protéines s'organisent avec différents partenaires pour définir deux groupes de facteurs de polarité, se localisant spécifiquement au niveau du pôle postérieur ou antérieur de l'embryon (Fig. 24). Le premier groupe de facteurs « postérieurs » se compose des protéines Par-1, Par-2 et Lgl (Guo and Kemphues, 1995 ; Boyd et al, 1996 ; Hoege et al, 2010), tandis que le deuxième groupe de facteurs « antérieurs » forme le complexe PAR : Par-3/Par-6/aPKC qui s'assemble, comme dans les neuroblastes *D.melanogaster*, sous l'action polarisée de Cdc42 (Joberty et al, 2000 ; Lin et al, 2000 ; Li et al, 2010). Avant la fécondation, ces facteurs de polarité se localisent de manière isotropique autour du cortex embryonnaire. L'établissement des flux corticaux permet ensuite de créer une asymétrie transitoire favorisant une localisation antérieure du complexe Par-3/Par-6/aPKC (Munro et al, 2004). Le maintien et l'amplification de cette asymétrie repose alors sur la mise en place d'un double rétro-contrôle négatif impliquant un antagonisme réciproque entre les deux groupes de déterminants (Goehring et al, 2011). Ce système requiert la phosphorylation de Par-1, Par-2 et Lgl par la kinase aPKC (Hurov et al, 2004 ; Hoege et al, 2010 ; Motegi et al, 2011), et la

phosphorylation de Par-3 par la kinase Par-1 (Cuenca et al, 2003 ; Motegi et al, 2011). Ces différentes phosphorylations sont nécessaires pour empêcher les protéines de chacun des groupes de se lier au niveau du cortex opposé (Betschinger et al, 2005 ; Krahn et al, 2010 ; Motegi et al, 2011). Ainsi, et en accord avec ce modèle, la perte de la polarité antérieure de Par-3 permet une relocalisation isotropique des déterminants postérieurs (Gotta et al, 2001), tandis que la perte de polarité postérieure de Par-1, Par-2 et Lgl a un effet similaire sur la localisation des déterminants antérieurs (Motegi et al, 2011).

b) Positionnement du fuseau

Après la fécondation, les pronucléi mâle et femelle du zygote de *C.elegans* migrent vers le centre de la cellule et le fuseau commence à s'assembler à partir des deux centrosomes. Une fois formé, le fuseau pivote de 90° pour s'orienter parallèlement à l'axe antéro-postérieur de l'embryon. Comme pour le neuroblaste, les cellules filles issue de la division du zygote diffèrent de par leur taille, mais cette fois, l'asymétrie de la division repose sur la translocation du fuseau vers le pôle postérieur de la cellule lors de l'anaphase (Fig .24). Les processus de rotation et de translocation du fuseau sont, une nouvelle fois, dépendants de la mise en place de forces de traction s'appliquant sur les microtubules astraux depuis le cortex cellulaire (Grill and Hyman, 2005).

Différentes études, impliquant notamment des ablations laser, ont permis de mettre en évidence l'existence d'une polarisation des forces s'exerçant sur

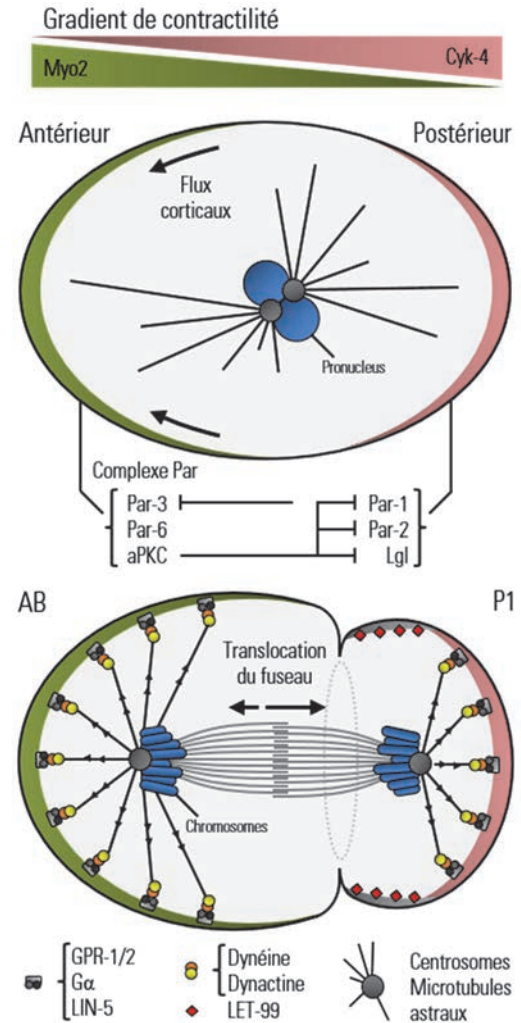


Figure 24 : Division asymétrique du zygote de *C.elegans*

Suite à la fécondation, l'inhibition polarisée de la myosine 2 par la GAP Cyk-4, permet la création d'un flux cortical d'actine favorisant le transport et l'accumulation antérieur du complexe Par. De ce fait, la polarisation d'aPKC antagonise les facteurs Par-1, Par-2 et Lgl qui, en conséquence, s'accumulent au niveau du pôle postérieur. En retour, Par-1 s'oppose à la localisation postérieure d'aPKC et permet ainsi le maintien de la polarisation. En anaphase, le positionnement du fuseau repose sur la capture/traction des microtubules astraux par le complexe GPR1-2/Gα/LIN-5. Ce complexe se localise au niveau du cortex et recrute de la dynéine pour qu'elle exerce les forces nécessaires au déplacement du fuseau. Le facteur LET-99, qui inhibe la localisation corticale de GPR-1/2, permet enfin de moduler la résultante des forces s'exerçant sur le fuseau et favorise la translocation postérieure de ce dernier.

le fuseau et favorisant sa translocation postérieure (Grill et al, 2001 ; Kozlowski et al, 2007). Ces forces font appel à la sous-unité $G\alpha$ de l'hétérotrimère de protéine G et à ses effecteurs GPR-1 et GPR-2 qui sont les orthologues de Pins chez *C.elegans* (Gotta et al, 2003 ; Colombo et al, 2003). A l'image de ce qui se déroule dans le neuroblaste, GPR1-2 sont attirés par $G\alpha$ au niveau du cortex où ils se lient à la protéine adaptatrice LIN-5 (orthologue de Mud et NuMA) (Srinivasan et al, 2003). Une fois formé, le complexe GPR1-2/ $G\alpha$ /LIN-5 recrute la dynéine-dynactine, associées dans ce contexte au facteur LIS-1, et favorise la capture de l'extrémité plus des microtubules astraux. Cet ancrage cortical des microtubules et de la dynéine autorise alors la mise en place des forces de tractions permettant de modifier le positionnement du fuseau (Nguyen-Ngoc et al, 2007 ; Couwenbergs et al, 2007). Ce modèle est supporté par l'observation de défauts de positionnement du fuseau similaires en cas de perturbation du complexe GPR1-2/ $G\alpha$ /LIN-5 ou de l'inactivation génétique de la dynéine-dynactine (Gotta et al, 2003 ; Colombo et al, 2003 ; Srinivasan et al, 2003 ; Nguyen-Ngoc et al, 2007 ; Couwenbergs et al, 2007).

D'autres travaux ont permis de faire le lien entre le mécanisme de positionnement du fuseau et la polarité corticale des protéines Par. La relation entre ces deux processus repose sur la capacité de ces protéines à réguler la localisation du facteur LET-99. Ce facteur est, en effet, capable d'inhiber l'association de GPR1-2 avec le cortex cellulaire et permet, de ce fait, de moduler la localisation des points d'ancrage des microtubules astraux (Tsou et al, 2002 ; Tsou et al, 2003) (Fig. 24). Lors de l'anaphase, LET-99 se localise sous la forme d'une ceinture corticale dans la partie postérieure de l'embryon. Cette localisation a pour conséquence de modifier la résultante des forces s'exerçant sur le fuseau et de favoriser sa translocation vers le pôle postérieur (Park et al, 2008). Cependant, la nature exacte des relations entre les protéines Par et le facteur LET-99, ainsi que le mécanisme permettant à ce facteur d'inhiber la localisation corticale de GPR1-2, sont encore inconnus.

OBJECTIFS DE LA THESE

Comme nous l'avons vu précédemment, le caractère asymétrique des divisions méiotiques de l'ovocyte de souris repose sur le positionnement excentré du fuseau et sur l'établissement d'une polarisation cellulaire. Ces deux phénomènes sont interdépendants et fonctionnent selon un mécanisme d'auto-amplification mutuel centré sur la chromatine. Cette dernière permet, en effet, d'activer localement la GTPase Ran et favorise, par cet intermédiaire, l'assemblage corticale et polarisé d'un dôme de filaments d'actine entouré par un anneau de myosine 2. L'accumulation de ces filaments joue un rôle essentiel dans le positionnement asymétrique du fuseau et semble participer à l'émission des globules polaires. En plus de l'acto-myosine, le dôme polarisé se caractérise également par une absence de microvilli qui, normalement, se localisent tout autour du cortex ovocytaire. On considère que cette exclusion des microvilli s'oppose localement à la fusion du spermatozoïde et protège ainsi le fuseau des interférences que pourrait provoquer l'incorporation des chromosomes paternels à cet endroit.

Au début de ma thèse, nous avons donc décidé d'étudier la nature des mécanismes permettant de relier la signalisation Ran à la polarisation ovocytaire. Nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à l'influence de la GTPase Cdc42 connue pour réguler l'assemblage des filaments d'actine dans de nombreux modèles. Nous avons ensuite testé le rôle de Ran et celle d'autres GTPases (Rac-1 et Cdc42) sur le phénomène d'exclusion des microvilli dans le cortex polarisé.

Enfin, nos travaux se sont portés sur le rôle de l'acto-myosine lors de la deuxième division méiotique de l'ovocyte. Cette division requiert la rotation à 90° du fuseau lors de l'anaphase et se caractérise par la mise en place de deux dômes corticaux polarisés au dessus de chacun des lots de chromatides. Dans ce contexte, et en nous appuyant sur nos travaux concernant Ran et Cdc42, nous avons étudiés la dynamique de polarisation de l'ovocyte et nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la régulation corticale de la myosine 2.

RESULTATS

A. Signalisation par les GTPases Ran et Cdc42 au cours de la polarisation et des divisions asymétriques de l'ovocyte de souris

1. Problématique

La polarisation de l'ovocyte de mammifère se caractérise notamment par la disparition des microvillosités membranaires et par l'accumulation d'un dôme d'actine au niveau du cortex surplombant le fuseau méiotique (Longo et Chen, 1985 ; Maro et al, 1986). Comme nous l'avons vu précédemment, différentes études ont révélé le rôle primordial des chromosomes dans ce processus. En effet, ces derniers sont porteurs d'un gradient de Ran-GTP qui permet, à distance, l'induction de cette polarisation (Verlhac et al, 2000 ; Dumont et al, 2007a ; Deng et al, 2007). Le gradient de Ran-GTP autorise une activation locale du complexe Arp2/3, aboutissant à la nucléation des filaments d'actine du dôme polarisé (Deng et al, 2007 ; Yi et al, 2011). La formation de ce dôme est essentielle au positionnement excentré du fuseau de MII et participe vraisemblablement à la migration du fuseau de MI (Yi et al, 2011 ; Yi et al, 2013). Cependant, la description de la voie de signalisation agissant en aval de Ran-GTP reste, à ce jour, très incomplète.

Au vu du rôle reconnu des GTPases de la famille Rho (RhoA, Rac, Cdc42) dans la régulation de la dynamique des filaments d'actine (Heasman et Ridley, 2008), nous avons décidé d'examiner l'implication de ces GTPases dans le processus de polarisation de l'ovocyte de souris. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la GTPase Cdc42, connue pour être, via son effecteur N-WASP, un activateur de la polymérisation d'actine dépendant du complexe Arp2/3 (Rohatgi et al, 1999 ; Heasman et Ridley, 2008 ; Liu, 2012). Dans un premier temps, notre stratégie a été de détecter la forme active de Cdc42 (Cdc42GTP) au moyen d'une sonde fluorescente se fixant spécifiquement à Cdc42-GTP (EGFP-wGBD, Benink et Bement, 2005). Nous avons ensuite, par surexpression d'une forme dominante-négative, réussi à inhiber cette GTPase et ainsi pu évaluer son rôle lors des divisions asymétriques de l'ovocyte. Enfin, nous avons également examiné l'implication des signalisations Ran et Cdc42 dans la régulation des protéines de la famille ERM (Ezrin, Radixin, Moesin), connues pour jouer un rôle majeur dans l'assemblage et le maintien des microvillosités (Yonemura et al, 1999 ; Fehon et al, 2010).

2. Résultats

a) Rôle de Cdc42GTP lors des divisions asymétriques de l'ovocyte.

Nos observations en microscopie confocale ont révélé que Cdc42-GTP se localise de manière polarisée, au niveau du cortex surplombant le fuseau de MI et de MII. Durant la méiose I, l'activation polarisée de Cdc42 n'est détectable qu'à la condition d'une forte proximité entre les chromosomes et le cortex ovocytaire. En métaphase II, Cdc42-GTP présente une localisation persistante dans le cortex surplombant le fuseau, et se maintient au-dessus des chromosomes suite au désassemblage du fuseau par le nocodazole. La surexpression d'une forme dominante-négative de Ran (RanT24N) inhibe, en revanche, toute polarisation de Cdc42GTP dans l'ovocyte MII. Lors de l'anaphase II (AII), déclenchée artificiellement par exposition des ovocytes à l'éthanol, Cdc42GTP se polarise au niveau des deux protrusions membranaires accompagnant chacun des deux lots de chromatides en cours de ségrégation. Suite à la rotation du fuseau et à la rétractation d'une des deux protrusions membranaires, Cdc42GTP se localise uniquement au niveau du cortex destiné à former le deuxième globe polaire (2^{ème} GP). Ainsi, la localisation corticale de Cdc42-GTP, lors de la méiose ovocytaire, présente une dépendance à la chromatine très similaire à celle du dôme d'actine.

Afin de tester l'influence de la polarisation de Cdc42-GTP sur la formation du dôme d'actine, nous avons ensuite inhibé l'activité de cette GTPase par la surexpression d'une forme dominante-négative (Cdc42T17N). Ces expériences ont permis d'abolir la polarisation de l'actine dans tous les stades de la méiose ovocytaire que nous avons testés (MI tardive, MII et AII). Afin de vérifier la spécificité de cette approche, nous avons mis en évidence, à l'aide d'un anticorps spécifique, une délocalisation de N-WASP (normalement polarisé) dépendante de l'inhibition de Cdc42. Par la suite, nous avons également testé l'influence de l'inhibition de Cdc42 sur le taux d'émission des globules polaires. Lors de la deuxième division méiotique, seulement 15% des ovocytes surexprimant Cdc42T17N émettent le 2^{ème} GP dans les 2 heures qui suivent leur activation (contre 94% pour les contrôles). A ce stade, l'inhibition de Cdc42-GTP a pour conséquence d'empêcher les protrusions membranaires et d'entraîner des anomalies dans la morphologie et la localisation du fuseau (perte de la bipolarité, éparpillement des chromatides). Lors de première division méiotique, l'inhibition de Cdc42 perturbe également l'émission du 1^{er} GP mais dans une moindre mesure. En effet, 34% des ovocytes se divisent asymétriquement, 18% se divisent symétriquement et 48% échouent à émettre le 1^{er} GP. Ces résultats suggèrent une inhibition incomplète de Cdc42-GTP ou l'existence d'un mécanisme alternatif permettant de compenser en partie cette inhibition.

L'ensemble de nos résultats concernant l'activation polarisée de Cdc42, combiné à ceux ayant permis de relier la N-WAP à Arp2/3 (Sun SC et al, 2011 ; Yi et al, 2011), nous permettent de suggérer la cascade de signalisation suivante pour expliquer la formation du dôme d'actine : Chromosomes/Ran-GTP/Cdc42-GTP/N-WASP/Arp2/3/Actine polarisée. Cette cascade de signalisation fonctionne aussi bien en méiose I qu'en méiose II, et est également impliquée dans l'émission des GP.

b) Influence des Rho GTPases sur la polarisation des ERMs

Les ERMs (Ezrine Radixine Moesine) sont une famille de protéines possédant des domaines de liaison aux protéines et lipides membranaires d'une part, et aux filaments d'actine d'autre part. Elles permettent de connecter la membrane plasmique au cytosquelette sous-jacent, et jouent ainsi un rôle-clé dans la régulation de la tension corticale et de la morphologie cellulaire. L'activation de ces protéines, par phosphorylation de leur partie C-terminale (phospho-ERMs), leur permet d'acquérir une conformation dite « ouverte », qui favorise leur ancrage à la membrane plasmique et aux filaments d'actine (Fehon et al, 2010).

Dans l'ovocyte de souris, les phospho-ERMs se localisent de manière systématique dans les microvillosités membranaires, et sont donc exclues du cortex surplombant le fuseau de MII (absence de microvillosités) (Larson et al, 2010). Ainsi, l'exclusion des phospho-ERMs représente, à l'instar du dôme d'actine, un autre aspect du phénomène de polarisation ovocytaire que nous avons souhaité étudier. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'influence de la chromatine sur la polarisation « négative » ou dépolarisation des phospho-ERMs.

A l'aide des mêmes outils moléculaires que décrits précédemment (RanT24N et le nocodazole), nous avons montré que la perte du signal phospho-ERMs dans le cortex polarisé requiert effectivement la proximité des chromosomes et la signalisation Ran-GTP qui leur est associé. En revanche, l'inhibition de Cdc42 (Cdc42T17N) ou de Rac-1 (Rac-1T17N), tous deux connus pour favoriser la perte des microvillosités dans d'autres types cellulaires (Nijhara et al, 2004 ; Faure et al, 2004), n'a pas permis d'affecter l'extinction du signal phospho-ERMs dans le cortex surplombant les chromosomes MII.

De même, nous montrons pour la première fois que l'exclusion polarisée des phospho-ERMs, déjà décrite en méiose II (Larson SM et al, 2010), fonctionne également lors de la méiose I, et est dépendante du gradient de Ran-GTP émanant de la chromatine. Cependant, ni Cdc42 ni Rac-1 ne semblent impliquées dans cette dépolarisation des phospho-ERMs, ce qui suggère l'existence d'une voie parallèle agissant en aval de Ran-GTP.

ARTICLE IN PRESS

Developmental Biology ■■■■■■■■■■



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/developmentalbiology



Polarized Cdc42 activation promotes polar body protrusion and asymmetric division in mouse oocytes

Benoit Dehapiot^{a,b}, Virginie Carrière^{a,b}, John Carroll^{c,*}, Guillaume Halet^{a,b,c,*}

^a CNRS, UMR 6290, Institut de Génétique et Développement de Rennes, F-35043 Rennes, France

^b Université Rennes 1, UEB, IFR 140, Faculté de Médecine, F-35043 Rennes, France

^c Department of Cell and Developmental Biology, University College London, Gower street, London WC1E 6BT, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 May 2012

Received in revised form

22 December 2012

Accepted 25 January 2013

Keywords:

Oocyte

Mouse

Meiosis

Cdc42

Polarity

Actin

ABSTRACT

Asymmetric meiotic divisions in mammalian oocytes rely on the eccentric positioning of the spindle and the remodeling of the overlying cortex, resulting in the formation of small polar bodies. The mechanism of this cortical polarization, exemplified by the formation of a thick F-actin cap, is poorly understood. Cdc42 is a major player in cell polarization in many systems; however, the spatio-temporal dynamics of Cdc42 activation during oocyte meiosis, and its contribution to mammalian oocyte polarization, have remained elusive. In this study, we investigated Cdc42 activation (Cdc42-GTP), dynamics and role during mouse oocyte meiotic divisions. We show that Cdc42-GTP accumulates in restricted cortical regions overlying meiotic chromosomes or chromatids, in a Ran-GTP-dependent manner. This polarized activation of Cdc42 is required for the recruitment of N-WASP and the formation of F-actin-rich protrusions during polar body formation. Cdc42 inhibition in MI oocytes resulted in the release of N-WASP into the cytosol, a loss of the polarized F-actin cap, and a failure to protrude the second polar body. Cdc42 inhibition also resulted in central spindle defects in activated MI oocytes. In contrast, emission of the first polar body during oocyte maturation could occur in the absence of a functional Cdc42/N-WASP pathway. Therefore, Cdc42 is a new protagonist in chromatin-induced cortical polarization in mammalian oocytes, with an essential role in meiosis II completion, through the recruitment and activation of N-WASP, downstream of the chromatin-centered Ran-GTP gradient.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

To become functional gametes competent for fertilization and preimplantation embryonic development, mammalian oocytes execute two rounds of asymmetric meiotic divisions, resulting in the formation of a large oocyte, which retains most of the maternal stores, and two small polar bodies. During the first meiotic division, homologous chromosomes are segregated, and genetic diversity is created through the resolution of the chiasmata (Holt and Jones, 2009). During the second meiotic division, which in mammals is completed only after fertilization, sister chromatids are segregated in a manner that resembles mitotic cell division (Perry and Verlhac, 2008).

The strong asymmetry of oocyte meiotic divisions is driven by spindle positioning in the vicinity of the cortex. During meiosis I (MI), the first meiotic spindle forms in the centre of the oocyte and

migrates along its long axis towards the nearest cortical region (Verlhac et al., 2000). Recent studies have revealed the key role of cytoplasmic actin filaments nucleated by Formin-2 (Fmn2) and Spire-type actin nucleators, in driving spindle migration (Azoury et al., 2008; Li et al., 2008; Schuh and Ellenberg, 2008; Pfender et al., 2011). When homologous chromosome separation is initiated, the MI spindle has reached a subcortical location, resulting in a first asymmetric division and the extrusion of one set of chromosomes in the first polar body (PB1). The chromosomes that are retained in the oocyte then promote the assembly of the Metaphase II (MII) spindle, which remains anchored to the cortex of the ovulated oocyte. Upon fertilization, meiosis resumes and a second asymmetric cell division leads to the extrusion of the second polar body (PB2), containing one set of segregated chromatids.

Eccentric spindle positioning, which is instrumental in the asymmetric division process, triggers a profound remodeling of the overlying cortical region (hereafter referred to as the polarized cortex), including disappearance of membrane microvilli, formation of a thick F-actin cap and polarized accumulation of myosin II, PAR3, PAR6 and activated Rac GTPase (Longo and Chen, 1985; Maro et al., 1986; Simerly et al., 1998; Vinot et al., 2004;

* Corresponding authors

E-mail addresses: j.carroll@ucl.ac.uk (J. Carroll), guillaume.halet@univ-rennes1.fr (G. Halet).

0012-1606/\$ - see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.01.029>

Duncan et al., 2005; Deng et al., 2007; Halet and Carroll, 2007). The mechanism and role of this cortical remodeling are not completely understood. Early studies have revealed the unique ability of meiotic chromosomes to induce cortical remodeling in a microtubule-independent manner (Longo and Chen 1985; Maro et al. 1986), and a recent report has uncovered the instrumental role of the GTPase Ran in this process (Deng et al., 2007). Ran is activated (Ran-GTP) by the GTP/GDP exchange factor RCC1, which is bound to chromatin, resulting in the generation of a Ran-GTP gradient centered on the meiotic chromosomes (Dumont et al., 2007). This diffusible Ran-GTP signal is necessary for meiotic chromosomes to induce, at a distance, remodeling of the nearby cortex, such as formation of the F-actin cap (Deng et al., 2007). However, the molecular cascade initiated by Ran to polarize the oocyte is poorly understood.

In other systems, from budding yeast to mammalian epithelia, cell polarization is frequently associated with polarized activation of the Rho GTPase Cdc42 (Heasman and Ridley, 2008). Interestingly, N-WASP, a Cdc42 effector involved in actin filament nucleation and branching (Miki et al., 1996; Rohatgi et al., 1999), was recently reported to accumulate in the polarized cortex of mouse MII oocytes (Yi et al., 2011). In addition, the Arp2/3 complex, a major actin filament nucleator and downstream effector of N-WASP, was shown to localize at the polarized cortex and to be required for the formation of the F-actin cap overlying the meiotic spindle (Yi et al., 2011; Sun et al., 2011). Overall, these findings point to a possible role for Cdc42 as the upstream activator of the N-WASP/Arp2/3 machinery in oocyte polarization. However, evidence for a polarized activation of Cdc42 in mammalian oocytes is currently missing.

To examine a possible role for Cdc42 activation in oocyte polarization, we employed a genetically-encoded fluorescent probe based on the Cdc42-binding domain of WASP (EGFP-wGBD; Benink and Bement, 2005) to detect active, GTP-bound Cdc42 in live mouse oocytes. We show that Cdc42-GTP accumulates, in a polarized fashion, in the cortex overlying the meiotic spindle, during both meiosis I and II. Furthermore, we found that the polarized activation of Cdc42 is driven by the Ran-GTP gradient generated by meiotic chromosomes, from metaphase through anaphase. In addition, we demonstrate that Cdc42 inhibition results in N-WASP detaching from the cortex, and the loss of the F-actin cap. We further show that this Cdc42/N-WASP/F-actin cascade is required for membrane protrusion and cytokinesis during polar body formation in meiosis II, but seems dispensable for emission of the first polar body. A defect in central spindle formation, associated with chromatid scattering, was also observed in activated MII oocytes lacking Cdc42 activation. Therefore, Cdc42 is a new protagonist in the molecular cascade leading to mammalian oocyte polarization and asymmetric division, lying downstream of the cytoplasmic Ran-GTP gradient, and upstream of N-WASP activation at the cortex.

Materials and methods

Oocyte collection and culture

MF1 mice (4–6 week-old) or OF-1 mice (8–10 week-old) were injected with 7–10 IU PMSC (Intervet, Milton Keynes, England, or Sigma, Lyon, France) for priming, followed 48 h later by 5–7.5 IU hCG (Intervet, Milton Keynes, England or Sigma, Lyon, France) to induce ovulation. GV and MII oocytes were collected from antral follicles and oviducts, respectively, and recovered in M2 medium. Oocytes were maintained at the GV stage by supplementing M2 medium with 250 μ M dibutyryl-cAMP. For in vitro maturation, GV oocytes were cultured in M16 medium in a 5% CO₂ incubator.

To trigger oocyte activation and emission of the second polar body in a synchronized manner, MII oocytes were incubated for 8 min in M2 medium containing 7% ethanol, followed by wash, as described previously (Rogers et al., 2006). Ethanol treatment results in a single prolonged rise in cytosolic Ca²⁺ concentration, which recapitulates the events provoked by fertilization (Rogers et al., 2006). All reagents and media were from Sigma (Dorset, England, or Lyon, France), unless otherwise stated.

Expression of EGFP-wGBD, Cdc42T17N, Cdc42Q61L, Rac1Q61L and RanT24N

Plasmids encoding the Cdc42-GTP probe EGFP-wGBD (a generous gift from Bill Bement) and dominant-negative Cdc42T17N (obtained from Gary Bokoch via Addgene, plasmid 12973) were subcloned in pcDNA3.1. EGFP-Cdc42Q61L in pcDNA3 and EGFP-Rac1Q61L in pcDNA3 were obtained from Gary Bokoch (Addgene, plasmids 12981 and 12986). After plasmid linearization, cRNAs were prepared in vitro using the mMessage mMachine T7 Ultra kit (Ambion) and pressure-injected in GV or MII oocytes. Expression of the EGFP-wGBD probe was not associated with significant dominant-negative phenotype in previous studies (Kim et al., 2000; Cannon et al., 2001; Benink and Bement, 2005; Ma et al., 2006; Zhang et al., 2008), nor in the present study. To inhibit Ran function, oocytes were injected with purified RanT24N protein (Cytoskeleton, Denver, CO, USA; 0.5 μ g/ μ l in the pipette). Control oocytes were injected with an equivalent amount of water.

Immunostaining and F-actin staining

Oocytes were fixed in paraformaldehyde (3.7% in PBS) for 30 min and permeabilized with Triton X100 (0.25% in PBS) for 20 min. After a 3-hour incubation in a block solution consisting of 3% BSA in PBS, oocytes were incubated with primary antibodies at 4 °C overnight, washed three times, then incubated with the secondary antibodies for 1 h at 37 °C. The following primary and secondary antibodies were used: N-WASP 30D10 (1:100; rabbit monoclonal, Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA), alpha-tubulin (1:200; mouse monoclonal, Abcam, Paris, France), Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit IgG, and Alexa Fluor 555 Goat anti-rabbit IgG (all 1:1000; Life Technologies, Saint Aubin, France). To label F-actin, permeabilized oocytes were incubated for 5 min in PBS containing Alexa Fluor 546 Phalloidin (5 U/ml; Life Technologies), followed by wash. Chromatin was labeled with To-Pro-3 (5 μ M; Life Technologies) in fixed oocytes, and with Hoechst 33342 (5 μ g/ml; Life Technologies) in live oocytes.

Image acquisition and analysis

Oocytes were placed on glass-bottom dishes (MatTek, Ashland, MA, USA) and imaged using either an LSM510meta confocal microscope (Carl Zeiss Ltd.) equipped with 365, 488 and 543-nm laser lines, or a Leica SP5 confocal microscope equipped with 488, 561 and 633-nm laser lines. For live oocyte imaging, temperature was maintained at 37 °C using an incubator fitted on the LSM510meta confocal microscope, or using a stage top incubator (model INUBG2E-GSI, Tokai Hit, Shizuoka-ken, Japan) fitted on the Leica SP5 confocal microscope. Images were processed using MetaMorph (Molecular Devices, Wokingham, UK). Fluorescence profiles were generated with the linescan function in MetaMorph. Fluorescence intensities were expressed as mean \pm S.E.M. and statistical analysis (t-test) was performed using GraphPad QuickCalcs (graphpad.com).

Results

Cdc42 is activated in cortical regions overlying meiotic chromosomes

To examine Cdc42 activation, mouse oocytes were injected with cRNA encoding the Cdc42-GTP probe EGFP-wGBD (Benink and Bement, 2005). In previous studies, this probe was successfully used to detect localized Cdc42 activation in cancer cells (Kim et al., 2000), T cells (Cannon et al., 2001), and in the cortex of

Xenopus oocytes during wound healing or polar body emission (Benink and Bement, 2005; Ma et al., 2006; Zhang et al., 2008). In mouse oocytes arrested at the MII stage, the probe accumulated in a restricted cortical area overlying the MII spindle (Fig. 1A, top panels, arrow). This polarized distribution generated a sharp spike on a linescan fluorescence profile (Fig. 1A, bottom panel, arrow), reaching a fluorescence intensity more than two-fold higher than in the opposite cortex (average fold-increase in fluorescence intensity against the opposite cortex: 2.18 ± 0.38 , $n=16$; Fig. 1B).

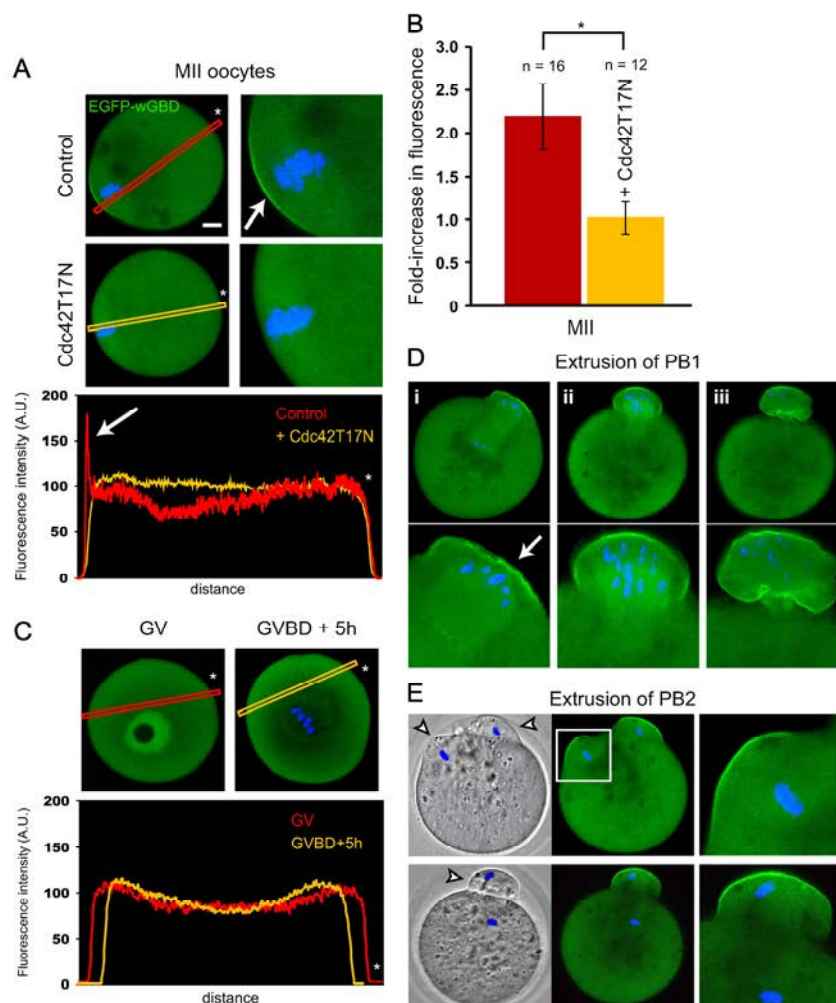


Fig. 1. Polarized activation of Cdc42 in the cortex of mouse oocytes. Cdc42-GTP was detected using the EGFP-wGBD probe in live mouse oocytes at various stages of meiosis. (A) Top panels: Cdc42-GTP accumulates in the cortical region overlying the MII chromosomes. The right image is a magnification of the MII spindle area, with an arrow highlighting the polarized Cdc42-GTP cap. The fluorescence linescan profile corresponding to the red box is shown on the lower panel (red, Control), with an arrow pointing at the fluorescence spike corresponding to the Cdc42-GTP cap. The middle panels show an MII oocyte co-expressing EGFP-wGBD and Cdc42T17N. Note the absence of a Cdc42-GTP cap, resulting in a flat fluorescence profile (yellow, Cdc42T17N). Orientation of the linescans is indicated by the white asterisks. (B) Bar chart displaying the fold-increase in EGFP-wGBD fluorescence in the polarized cortex (overlying the MII chromosomes), relative to the opposite cortex, as measured using linescan analysis. Red: control MII oocytes. Yellow: MII oocytes expressing Cdc42T17N. (C) EGFP-wGBD distribution in GV-arrested (top left image) and prometaphase I (GVBD+5 h, top right) oocytes. Note the lack of detectable Cdc42 activation at the cortex, resulting in flat fluorescence profiles (lower panel). (D) Cdc42-GTP dynamics during PB1 emission. Note the accumulation of Cdc42-GTP in the cortex overlying one set of segregated chromosomes at an early stage of PB1 protrusion (i, arrow), and in the cortex of the protruding (ii) or fully emitted PB1 (iii). Bottom images are magnifications of the polar body area. (E) Cdc42-GTP dynamics during PB2 emission. The top panel shows an activated MII oocyte at an early stage of anaphase II. Note the two cortical protrusions (arrowheads on the brightfield image) overlying the two sets of chromatids, and enriched in Cdc42-GTP. The right image is a magnification of the protrusion delineated by the white square. The bottom panels show an activated MII oocyte at a late stage of PB2 protrusion. Note the accumulation of Cdc42-GTP in the cortex of the emitted PB2 (arrowhead in the brightfield image; magnification on the right). *: $P < 0.001$. Green: EGFP-wGBD. Blue: chromatin. Bar: 10 μ m.

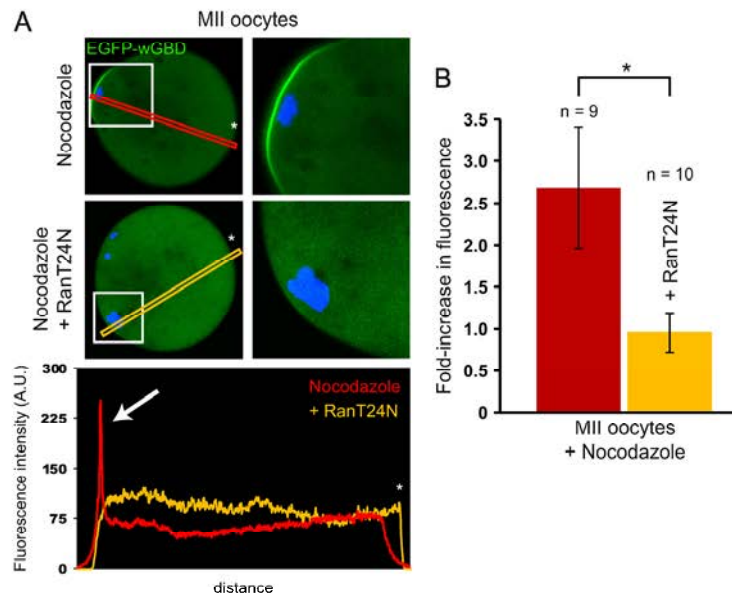


Fig. 2. Polarized Cdc42 activation is Ran-GTP-dependent. MII oocytes expressing EGFP-wGBD were treated with nocodazole (1 μ M for 30 min) in order to promote the formation of chromosome clusters apposed to the cortex. (A) Top panels: cortical Cdc42 activation (as detected by the localized accumulation of EGFP-wGBD) in the vicinity of a chromosome cluster. A magnified image is shown on the right. The corresponding increase in fluorescence is shown on the linescan analysis (bottom panel, white arrow). The middle panels show an MII oocyte injected with purified RanT24N. Note the absence of Cdc42 activation in the cortex overlying the chromatin mass, resulting in a flat fluorescence profile (bottom panel; RanT24N). Orientation of the linescans is indicated by the white asterisks. (B) Bar chart displaying the fold-increase in EGFP-wGBD fluorescence in the cortex overlying the chromosome cluster, relative to the opposite cortex devoid of chromosome cluster. Red: nocodazole-treated MII oocytes, injected with water. Yellow: nocodazole-treated MII oocytes injected with RanT24N. *: $P < 0.001$.

Inhibition of Cdc42 activation via the co-injection of cRNA encoding dominant-negative Cdc42T17N (Symons et al., 1996; Na and Zernicka-Goetz, 2006) resulted in partial or complete spindle detachment from the cortex, associated with a substantial reduction of the Cdc42-GTP cap, in a significant number of MII oocytes ($n=7/18$; data not shown). A similar spindle detachment was recently reported in oocytes treated with the Arp2/3 complex inhibitor CK-666, or following N-WASP knockdown (Yi et al., 2011). Spindle detachment effectively distances the chromatin from the cortex with the result that the chromatin-induced polarization is lost or reduced. To continue investigating the mechanism of Cdc42 action on cortical polarity, we therefore focussed on oocytes where the MII spindle had remained cortically-anchored, as exemplified in Fig. 1A (see also Figs. 2 and 3A). In these oocytes, Cdc42 inhibition (3–4 h following injection of cRNA encoding Cdc42T17N) resulted in the suppression of the cortical Cdc42-GTP cap (Fig. 1A, middle panels), and a flat fluorescence profile (fold-increase in fluorescence intensity: 1.01 ± 0.19 , $n=12$; Fig. 1A, bottom, and B).

To investigate the dynamics of Cdc42 activation during meiosis, we examined the distribution of the Cdc42-GTP probe in GV-arrested oocytes, and in oocytes undergoing maturation in vitro, following spontaneous meiosis resumption. In GV-stage oocytes, and in prometaphase I oocytes with a centrally-located spindle (CVBD + 5 h), the probe remained cytosolic and no cortical accumulation could be detected (Fig. 1C). The probe was also enriched in the GV; however, this accumulation was insensitive to Cdc42 inhibition (data not shown), arguing for a non-specific phenomenon. After the spindle had reached the cortex and the metaphase I-anaphase I transition occurred, a distinct Cdc42-GTP cap could be detected in the cortical region overlying the segregated homologs (Fig. 1Di, arrow). During polar body protrusion

(Fig. 1Dii) and until after cytokinesis (Fig. 1Diii). Cdc42-GTP remained enriched in the cortex of the first polar body. In the same way, in MII oocytes activated with ethanol to trigger anaphase II parthenogenetically, Cdc42-GTP accumulated in the two cortical protrusions overlying the two sets of segregated chromatids (Fig. 1E, top panels). At later stages, a single cortical protrusion remained and formed the second polar body, the cortex of which was enriched in Cdc42-GTP (Fig. 1E, bottom panels).

Altogether, these data suggest that in mouse oocytes undergoing the first or second meiotic division, Cdc42 is activated selectively in cortical regions overlying meiotic chromosomes or chromatids, with exactly the same dynamics as formation of the F-actin cap. This distribution is reminiscent of the polarized localization of the Rac-GTP probe PAK-PBD-YFP in regions overlying chromatin in mouse oocytes (Halet and Carroll, 2007). Oocytes expressing both EGFP-wGBD and PAK-PBD-mCherry exhibited strong co-localization of the two probes in the cortex overlying the MII spindle, and in the cortex overlying the chromatid cluster in PB2 (Fig. S1). These data suggest that oocyte polarization is associated with the activation of both Rac and Cdc42 in the cortex overlying meiotic chromatin.

Polarized Cdc42 activation is driven by the Ran-GTP gradient

The above data indicate that Cdc42 activation occurs when meiotic chromatin is localized in the vicinity of the cortex. This is reminiscent of the chromatin-induced F-actin cap formation, which requires the chromatin-centered Ran-GTP gradient (Longo and Chen, 1985; Maro et al., 1986; Deng et al., 2007). To address a direct role for meiotic chromatin in inducing Cdc42 activation, we treated MII oocytes with the microtubule poison

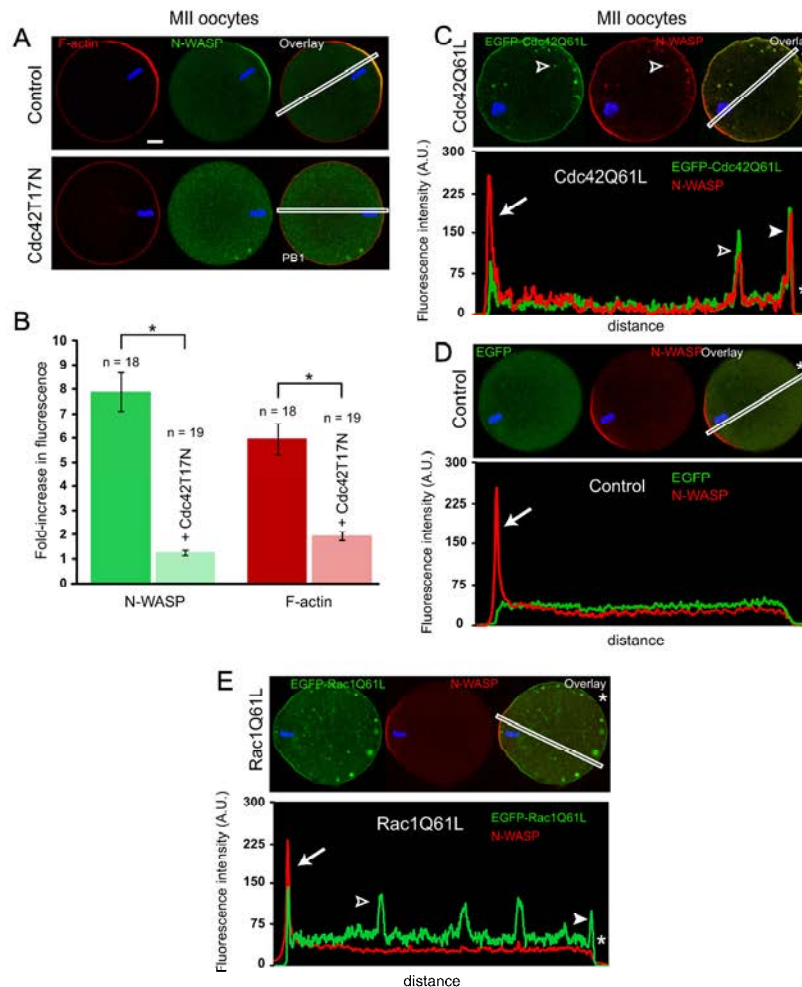


Fig. 3. Cdc42-GTP controls N-WASP localization at the cortex. MII oocytes were fixed and examined for endogenous N-WASP (immuno-staining) and actin filament (Alexa Fluor 546-phalloidin staining) distribution. (A) In control, water-injected MII oocytes, N-WASP co-localizes with the polarized F-actin cap (top panel; co-localization appears in yellow). In MII oocytes expressing Cdc42T17N, N-WASP is cytosolic and the F-actin cap is strongly decreased (lower panel). (B) Bar chart displaying the fold-increase in N-WASP (green bars) or F-actin (red bars) fluorescence in the cortex overlying the MII chromosomes, relative to the opposite cortex. The data are based on fluorescence profiles generated across the oocyte diameter, as shown by the white boxes in (A). Control oocytes are in dark green/red; oocytes expressing Cdc42T17N are in light green/pink. *: $P < 0.001$. (C) In oocytes expressing constitutively-active EGFP-Cdc42Q61L, N-WASP staining re-distributes around the oocyte cortex and on cytoplasmic vesicles, co-localized with EGFP-Cdc42Q61L (co-localization is in yellow on the overlay image). The open arrowhead points to a cytoplasmic vesicle positive for N-WASP and EGFP-Cdc42Q61L staining. The corresponding fluorescence profile is shown, where the arrow points at the cortex overlying the MII chromosomes, the closed arrowhead points at the opposite cortex, and the open arrowhead points at the cytoplasmic vesicle mentioned above. Note the overlapping fluorescence spikes showing co-localization of N-WASP with EGFP-Cdc42Q61L. (D) N-WASP staining is restricted to the polarized cortex overlying the MII chromosomes in control oocytes expressing EGFP alone. The fluorescence profile corresponding to the white box is shown, with an arrow pointing at the cortical N-WASP accumulation over the MII chromosomes. (E) In oocytes expressing constitutively-active EGFP-Rac1Q61L, N-WASP remains enriched in the polarized cortex overlying the MII chromosomes, and does not redistribute around the cortex, nor on cytoplasmic vesicles, where EGFP-Rac1Q61L is enriched. On the corresponding fluorescence profile, the arrow points at the cortex overlying the MII chromosomes, the closed arrowhead points at the opposite cortex, and the open arrowhead points at a cytoplasmic vesicle. Note the absence of N-WASP on these last two structures. Orientation of the linescans is indicated by the white asterisks.

nocodazole, a procedure which results in the formation of chromosome clusters closely associated with the cortex (Maro et al., 1986). As seen in Fig. 2A, a Cdc42-GTP cap was maintained in the cortex overlying the MII chromosome clusters (fold-increase in fluorescence intensity against the opposite cortex devoid of clusters: 2.67 ± 0.72 , $n=9$; Fig. 2B), arguing for a direct relationship between chromosome positioning and Cdc42 activation in the nearby cortex. This chromatin-induced Cdc42

activation was prevented by co-expression of Cdc42T17N (data not shown). To investigate the contribution of the Ran GTPase, we inhibited Ran-GTP production by injecting oocytes with purified dominant-negative RanT24N (Dasso et al., 1994). Because interfering with Ran function disturbs MII spindle integrity (Dumont et al., 2007a), and therefore could affect chromosome positioning, we used nocodazole-treated oocytes to ensure that chromosome clusters remained apposed to the cortex. In these conditions,

the Cdc42–GTP cap was abolished, despite the close proximity between chromatin clusters and the oocyte cortex (fold-increase in fluorescence intensity against the opposite cortex: 0.95 ± 0.24 , $n=10$; Fig. 2A and B). These data suggest that Cdc42 activation is controlled by the Ran–GTP gradient emanating from chromatin, providing an explanation for the restricted distribution of Cdc42–GTP in cortical regions overlying meiotic chromosomes.

Cdc42–GTP recruits N-WASP to the polarized cortex

The polarized accumulation of Cdc42–GTP in the oocyte cortex and in protruding polar bodies, suggests a contribution of the GTPase to cortical polarization, which is exemplified by the formation of an F-actin cap. In this regard, N-WASP is a strong candidate as a Cdc42 effector, since it links Cdc42 activation to actin filament nucleation and branching, via the activation of the Arp2/3 complex (Rohatgi et al., 1999). Consistent with a recent study (Yi et al., 2011), immuno-labeling experiments revealed a prominent accumulation of endogenous N-WASP in the cortex overlying the MII spindle, co-localized with the F-actin cap (Fig. 3A, upper panel). Remarkably, inhibition of Cdc42 activation with Cdc42T17N abolished the cortical localization of N-WASP (Fig. 3A, lower panel, and B). Interestingly, the loss of cortical N-WASP was accompanied by a selective loss of the F-actin cap, while the basal cortical F-actin layer remained unaffected (Fig. 3A, lower panel, and B).

To confirm a key role for Cdc42–GTP in controlling N-WASP localization, we examined whether constitutively-active Cdc42 could affect N-WASP distribution. We expressed constitutively-active Cdc42Q61L tagged with EGFP (EGFP–Cdc42Q61L) in MII oocytes. As shown in Fig. 3C (representative of 12 similar observations), the constitutively-active GTPase was broadly distributed around the oocyte cortex, and was also detectable on cytoplasmic vesicles, presumably of endocytic origin (open arrowhead). Endogenous N-WASP co-localized with EGFP–Cdc42Q61L both in the cortex and on the cytoplasmic vesicles (Fig. 3C). This colocalization is highlighted in the linescan fluorescence profile displayed in Fig. 3C, which passes through a cytoplasmic vesicle (open arrowhead). In contrast, in control oocytes injected with cRNA encoding EGFP alone, N-WASP localized exclusively to the polarized cortex and was not detected in the rest of the cortex, nor on cytoplasmic structures (Fig. 3D; representative of 15 similar observations). We also tested if active Rac was a binding partner for endogenous N-WASP. As shown in Fig. 3E (representative of 10 similar observations), N-WASP localized exclusively to the polarized cortex in MII oocytes expressing constitutively-active EGFP–Rac1Q61L. Though constitutively-active Rac1 distributed all over the cortex and on cytoplasmic vesicles, as seen with Cdc42Q61L, these structures were not associated with an enrichment in N-WASP in the case of RacQ61L (see the fluorescence profile in Fig. 3E, where the closed arrowhead points at the opposite cortex, and the open arrowhead points at a cytoplasmic vesicle). Together, these data suggest that in mouse oocytes, active Cdc42 is the preferred binding partner for driving N-WASP localization.

Since Cdc42 acts in synergy with the phosphoinositide PIP2 to localize and activate N-WASP (Prehoda et al., 2000; Rohatgi et al., 2000; Padrick and Rosen, 2010), the accumulation of N-WASP in the polarized cortex could be a consequence of a local enrichment in this phosphoinositide species. However, we have shown in a previous study that PIP2 is not enriched in the polarized cortex of MII oocytes. Rather, the amicrovillar polarized cortex shows a relatively low PIP2 abundance compared with the rest of the cortex, rich in microvilli (Halet et al., 2002). Therefore, we propose that polarized Cdc42–GTP is the major determinant of N-WASP distribution and activation in the mammalian oocyte cortex.

A polarized Cdc42/N-WASP/F-actin cascade is activated in meiosis I, but is dispensable for PB1 emission

In order to investigate whether the proposed Cdc42/N-WASP pathway contributes to the establishment of oocyte polarization, we examined N-WASP distribution at successive stages of oocyte maturation. In GV-stage oocytes, and in prometaphase I oocytes with a centrally-located spindle, N-WASP was essentially cytosolic and no cortical accumulation was detectable (Fig. 4Ai and ii). This is consistent with the finding that these oocytes also lack any detectable Cdc42 activation at the cortex (Fig. 1C). Also in agreement with these findings is the observation that cortical F-actin staining was uniformly distributed in the oocyte cortex (Fig. 4Ai and ii). In contrast, as the MI spindle reached the cortex (GVBD + 7/8 h, late prometaphase I), N-WASP started to accumulate in the cortical region overlying the spindle, coincident with the formation of a polarized actin cap (Fig. 4Aiii, arrowhead). During PB1 protrusion (Fig. 4Aiiii, early anaphase I), until after complete PB1 emission (Fig. 4Av, late anaphase I), N-WASP remained exclusively enriched in the cortex of the polar body, co-localized with a dense F-actin staining. These data suggest that, similar to our observations in MII-arrested oocytes (Fig. 3), meiotic chromosomes are capable of inducing, at a distance, N-WASP accumulation in the overlying cortex. This is consistent with our finding that Cdc42–GTP accumulates selectively in the cortex overlying the chromosomes during meiosis I (Fig. 1D).

In the light of these findings, we examined the effects of Cdc42 inhibition on the rate of PB1 emission in oocytes undergoing in vitro maturation. Consistent with previous studies (Na and Zernicka-Goetz, 2006; Cui et al., 2007; Bielak-Zmijewska et al., 2008), we found that 48% ($n=49/103$ oocytes) of oocytes expressing Cdc42T17N failed to emit PB1 following a 16-hour culture period. Staining for chromosomes and tubulin revealed that the spindle was centrally-located (data not shown), consistent with the defect in spindle migration previously reported (Na and Zernicka-Goetz, 2006; Cui et al., 2007). Another 18% ($n=19/103$) cleaved symmetrically to produce a polar body indistinguishable from the oocyte. The remaining 34% (35/103 oocytes) matured to MII and extruded a small polar body. During the same culture period, 92% (44/48 oocytes) of control, water-injected oocytes, extruded a small PB1 and arrested at MII (data not shown).

The observation that a third of oocytes expressing Cdc42T17N succeeded to emit a small PB1 was puzzling, as it suggested that Cdc42 was not inhibited. To investigate this issue, oocytes expressing Cdc42T17N were fixed at the time of polar body emission (GVBD + 7.5/8 h, as determined using time-matched control oocytes) and processed for N-WASP immuno-staining. As mentioned above, a significant proportion of these oocytes ($n=9/25$, 36%) exhibited a centrally-located MI spindle (as evidenced by chromosome labeling), and lacked any cortical N-WASP (Fig. 4Bi). The remaining oocytes ($n=16/25$) had proceeded to anaphase I and were observed at early (Fig. 4Bii) or late (Fig. 4Biii) stages of PB1 emission. Interestingly, N-WASP was virtually depleted from the cortex of these protruding polar bodies, despite close apposition of chromosomes to the cortex (Fig. 4Bii,iii). The enrichment in polymerized F-actin was also substantially decreased (Fig. 4Bii and iii). To quantify these data, we performed linescan fluorescence intensity measurements (like those shown in Fig. 1) along the axis of the anaphase I spindle, and we measured the increase in N-WASP or F-actin staining in the cortex of the polar body, relative to the opposite oocyte cortex. These measurements, summarized in the bar chart in Fig. 4C, revealed a five-fold decrease in N-WASP accumulation, and a two-fold decrease in F-actin staining in the cortex of the protruding polar bodies, following Cdc42 inhibition.

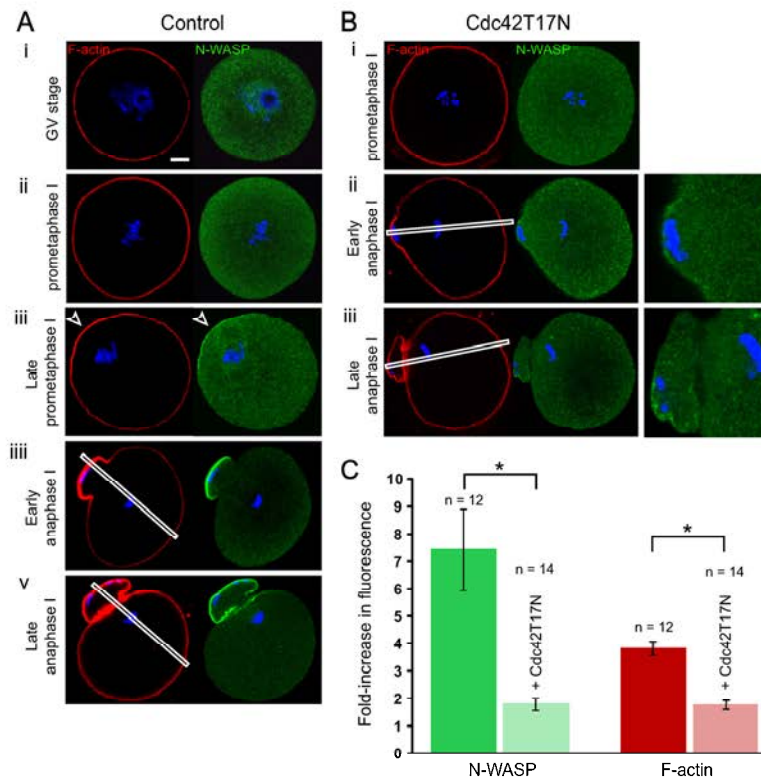


Fig. 4. Cdc42 controls N-WASP and F-actin accumulation in the polar body in meiosis I. (A) N-WASP (immuno-staining) and F-actin (Alexa Fluor 546-phalloidin staining) distribution was examined at successive stages of meiosis resumption: GV arrest (i), prometaphase I (GVBD + 5 h, ii), late prometaphase I (GVBD + 7/8 h, iii), early anaphase I (iiii), late anaphase I (v). Note the enrichment of N-WASP and F-actin in the cortex overlying meiotic chromosomes (arrowhead in iii) and in the cortex of the protruding first polar body (iiii, v). (B) Oocytes expressing Cdc42T17N were examined at 7.5/8 h post-GVBD. Thirty-six per cent of these oocytes exhibited a centrally-located spindle apparatus (i) and lacked any cortical N-WASP. The remaining oocytes had reached anaphase I, and were observed at early (ii) or late stages (iii) of polar body protrusion. Note the decrease in N-WASP and F-actin staining in the protruding polar bodies (see Aiii and Av for a comparison). Magnified images of N-WASP immuno-labeling in the polar body region are shown on the right. (C) Bar chart displaying the fold-increase in N-WASP (green bars) or F-actin (red bars) fluorescence in the cortex of the protruding PB1, relative to the opposite cortex. The data are based on fluorescence profiles generated across the oocyte diameter, as shown by the white boxes in Aiiii and Av for a comparison. Data from oocytes at early anaphase I and late anaphase I were pooled to generate the bar graph. Control oocytes are in dark green/red; oocytes expressing Cdc42T17N are in light green/pink. *: $P < 0.001$. Confocal images are representative of 9–16 similar observations.

To ensure that Cdc42T17N was effectively expressed in mouse oocytes undergoing PB1 emission, the amount of Cdc42 protein was quantified in oocyte lysates using the Western blot technique. These experiments revealed that injected oocytes expressed a ~7-fold excess of Cdc42T17N over endogenous Cdc42, at the time of PB1 formation (GVBD + 7 h; Fig. S2). In comparison, MII oocytes expressing the Cdc42T17N cRNA for three hours contained a ~three-fold excess of Cdc42T17N over endogenous Cdc42 (Fig. S2), which is sufficient to prevent N-WASP activation and formation of the F-actin cap (Fig. 3A). Therefore, it can be argued that oocytes examined at GVBD + 7 h express sufficient levels of Cdc42T17N to fully inhibit Cdc42 signaling.

Altogether, these results suggest that Cdc42 inhibition is effective, and precludes N-WASP recruitment at the cortex, in oocytes undergoing PB1 protrusion. These data therefore argue for the existence of a compensatory mechanism driving polar body protrusion in the absence of a functional Cdc42/N-WASP pathway. Alternatively, a minute amount of cortical N-WASP and a highly diminished F-actin cap may suffice to support polar body protrusion in meiosis I.

Cdc42 inhibition in activated oocytes prevents emission of PB2 and induces central spindle defects

We next investigated N-WASP dynamics and the relevance of the Cdc42/N-WASP/F-actin cascade during PB2 emission in activated MII oocytes. In control conditions, N-WASP accumulated symmetrically in cortical protrusions overlying the two sets of segregated chromatids, and later became restricted to the polar body-forming protrusion (Fig. 5Ai–iii; $n = 10$ –12 similar observations). Polarized F-actin co-localized with N-WASP and followed essentially the same dynamics (Fig. 5Ai–iii). At the pronuclear stage (~5 h post-activation), F-actin was uniformly distributed in the oocyte cortex, and N-WASP was cytosolic in the oocyte (Fig. 5Aiii; representative of 11 similar observations). These data are consistent with a chromatin-centered diffusible signal driving N-WASP accumulation in the cortex overlying the chromatids. In support of this model, and in agreement with a recent study (Yi et al., 2011), nocodazole-induced chromosome clusters induced N-WASP and F-actin caps in the nearby cortex, that were inhibited by dominant-negative RanT24N (data not shown).

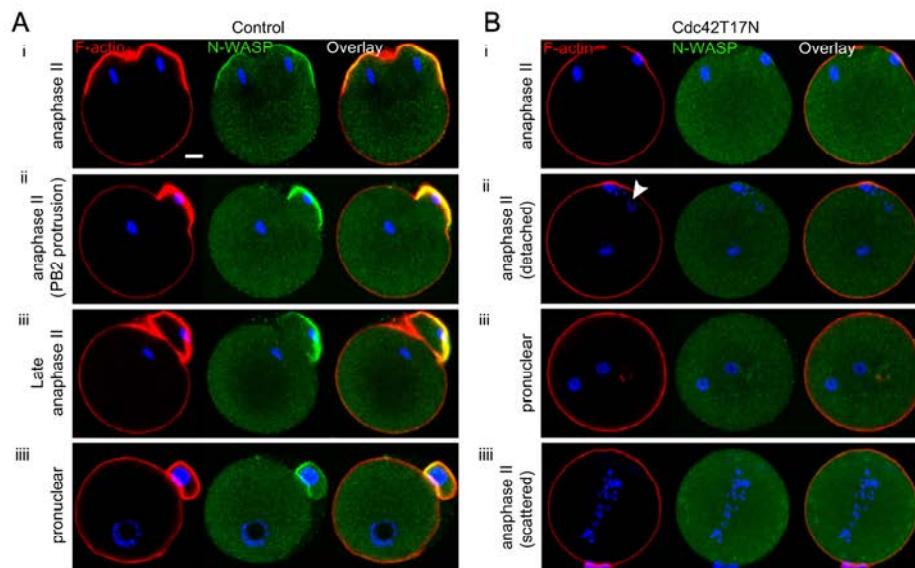


Fig. 5. Cdc42 activation is required for PB2 emission in activated oocytes. (A) Ethanol-activated MII oocytes were examined for F-actin and N-WASP staining at successive stages of PB2 emission: early anaphase II (i), PB2 protrusion (ii), late anaphase II (fully emitted PB2, iii), and pronuclear stage (iiii). Note the enrichment of N-WASP in F-actin-rich cortical protrusions overlying the chromatid masses in (i) and (ii). (B) MII oocytes expressing Cdc42T17N were activated with ethanol and examined for F-actin and N-WASP staining at early anaphase II (i and ii) and at the time of pronucleus formation (iii, iii). Note the absence of cortical N-WASP at all stages, and the lack of polar body protrusion. In (ii), note the perpendicular orientation of the spindle apparatus and the chromatid scattering (arrowhead). Bar: 10 μ m.

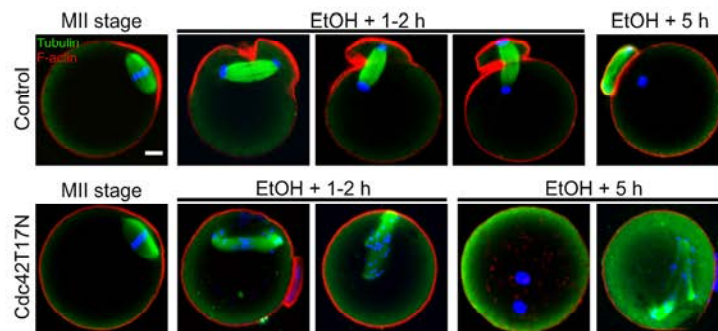


Fig. 6. Cdc42 inhibition induces central spindle and cytokinesis defects in activated oocytes. MII oocytes were examined for F-actin and tubulin staining during the MII arrest (MII stage), 1–2 h after ethanol activation (EtOH+1–2 h), and at the time of pronucleus formation (EtOH+5 h). Upper panels: control oocytes, injected with water. Note the robust and strictly bipolar central spindle. Lower panels: oocytes expressing Cdc42T17N. Note the chromatid scattering and spindle distortion at 1–2 h and 5 h post-activation. At 5 h post-activation, the majority of oocytes expressing Cdc42T17N were binucleated (left image) or blocked in meiosis with a distorted spindle (right image). Images of EtOH-activated oocytes are compressed Z-stacks of 2–8 images, in order to capture the entire spindle structure. Red: F-actin. Green: tubulin. Blue: chromatin. Bar: 10 μ m.

Overall, these data suggest that N-WASP and F-actin dynamics in anaphase II are controlled by the Ran–GTP gradients emanating from each set of segregated chromatids.

In oocytes expressing Cdc42T17N, the great majority (47/55 oocytes; 85%) failed to extrude a polar body in the two hours following ethanol activation (against 94% of PB2 emission in control oocytes). Examination of N-WASP dynamics revealed that the Cdc42 effector remained cytosolic throughout the activation process, and F-actin-rich protrusions were absent, despite close apposition of chromatids to the cortex (Fig. 5Bi, $n=14$; see Fig. 5Ai for a comparison with controls). Some oocytes ($n=4$) showed anaphase figures oriented perpendicular to the cortex, which could be due to the MII spindle detaching from the cortex

before the oocytes were challenged with ethanol. In these oocytes, the chromatid mass apposed to the oocyte cortex also failed to induce the recruitment of N-WASP and the formation of an F-actin-rich protrusion (Fig. 5Bii, $n=4$; see Fig. 5Ai for a comparison). These observations suggest that Cdc42 signaling was effectively inhibited by Cdc42T17N, precluding N-WASP binding to the cortex and the formation of F-actin-rich protrusions in anaphase II, ultimately resulting in a failure to emit PB2.

Activated MII oocytes expressing Cdc42T17N were next examined for pronucleus formation five hours after activation. A majority of these oocytes (13/22 oocytes; 59%) were binucleated, indicating that, consistent with a failure to form F-actin-rich protrusions necessary for PB2 formation, these oocytes failed to

undergo cytokinesis (Fig. 5Biii). Another third of the oocytes (8/22; 36%) failed to exit meiosis and to form pronuclei, but instead exhibited chromatid scattering across the cytosol (Fig. 5Biii). To examine the integrity of the spindle, oocytes injected with water (controls) or expressing Cdc42T17N were processed for tubulin immuno-staining. In controls, the robust central spindle formed in anaphase remained strictly bipolar for the duration of the PB2 emission process (Fig. 6A top row, EtOH+1–2 h), and 86% ($n=45/52$ oocytes) of oocytes examined at 5 h post-activation exhibited a second polar body and a single pronucleus (Fig. 6A top row, EtOH+5 h). In oocytes expressing Cdc42T17N, chromatid scattering and spindle distortions were apparent in a fraction of oocytes ($n=9/30$) examined 1–2 h following ethanol activation (Fig. 6A bottom row; EtOH+1–2 h; see also Fig. 5Bii, arrowhead). At 5 h post-activation (Fig. 6A bottom row, EtOH+5 h), Cdc42T17N-expressing oocytes were mainly binucleated ($n=15/28$) or arrested in meiosis with a distorted spindle and scattered chromatids ($n=9/28$). Thus, in addition to causing defective cortical polarization and a failure to emit PB2, Cdc42 inhibition also interfered with the formation of a functional central spindle capable of supporting chromatid segregation and cytokinesis during meiosis resumption in activated oocytes.

Discussion

The development of an F-actin cap in the cortex overlying the metaphase spindle is a conserved feature of oocyte polarization in mammals, amphibians and lower invertebrates (Longo and Chen, 1985; Maro et al., 1986; Sardet et al., 1992; Zhang et al., 2008). In mouse oocytes, the thick F-actin cap overlying the MII spindle was first described over 25 years ago (Longo and Chen, 1985; Maro et al., 1986), but it is only recently that mechanistic insights were provided, through the finding that the F-actin cap is induced by the Ran-GTP gradient generated by meiotic chromosomes (Deng et al., 2007). The same group has recently reported that the machinery for actin filament nucleation, comprising the Arp2/3 complex and its upstream regulator N-WASP, also localized in the polarized cortex in a Ran-GTP-dependent manner, and was responsible for generating a flow of actin filaments and cytoplasmic streaming necessary to maintain the MII spindle in its eccentric location (Yi et al., 2011). Therefore, the next challenge in our understanding of mammalian oocyte polarization and spindle positioning, is to identify the mechanism by which Ran-GTP promotes the polarized activation of the N-WASP/Arp2/3 machinery in the oocyte cortex (Verlhac, 2011).

We now introduce Cdc42 as a new protagonist in the molecular cascade leading to oocyte polarization. Through the direct monitoring of Cdc42-GTP, we describe for the first time the polarized activation of Cdc42 in the cortex overlying the meiotic spindle in mouse oocytes (Fig. 1). Our data suggest that the polarized activation of Cdc42 is driven by the Ran-GTP gradient emanating from meiotic chromosomes, and serves to recruit N-WASP at the cortex to build the F-actin cap. According to the current model, N-WASP activation most certainly involves coincident binding to Cdc42-GTP and PIP2 in the plasma membrane, to relieve autoinhibition (Padrick and Rosen, 2010). However, a direct contribution of PIP2 in the polarized recruitment of N-WASP is unlikely, since our previous work has shown that PIP2 is not enriched in the polarized cortex of MII oocytes (Halet et al., 2002). Thus, we propose the following signaling cascade for mouse oocyte polarization:

Chromosomes → Ran → Cdc42 → N-WASP → Arp2/3 → F-actin cap

The same signaling cascade operates during anaphase, resulting in the formation of F-actin-rich protrusions overlying the segregated chromosomes (anaphase I) or chromatids (anaphase II). Experiments using Cdc42T17N to disrupt Cdc42 activation and N-WASP localization, suggest that this signaling cascade is essential for the emission of PB2 in activated MII oocytes. One attractive hypothesis is that N-WASP-driven actin filament nucleation and branching provides the protrusive force necessary for membrane deformation around the segregated chromatids, to form the polar body (Condeelis, 1993; Pollard and Borisy, 2003). Considering that cortical tension, which is dependent on F-actin, is increased almost 3-fold in the polarized amicrovillar cortex of MII oocytes (Jégou et al., 2008; Larson et al., 2010), it is tempting to assume that the polarized Cdc42-GTP/N-WASP pathway also serves to prevent the collapse of the second polar body, by maintaining a thick cortical F-actin layer and increased cortical rigidity in the protruded membrane. Further investigations will be necessary to elucidate how the actin filaments forming the polarized F-actin cap in MII oocytes can fulfill these multiple roles – i.e., actin flow, cortical tension and membrane protrusion – and how this is regulated in space and time during the meiotic cell cycle.

There is increasing evidence that Cdc42, beyond its ubiquitous function as a regulator of actin dynamics, could be involved in spindle and chromosome dynamics during the cell cycle. In mitosis, Cdc42 inhibition was shown to result in abnormal chromosome segregation, due to defective kinetochore-microtubule attachments and chromosome congression in metaphase (Yasuda et al., 2004; Ocegueda-Yanez et al., 2005). Consistent with a role for Cdc42 in regulating spindle dynamics, Cui et al. (2007) reported that injection of siRNA against Cdc42 resulted in spindle defects in MII oocytes. Apart from occasional spindle detachment, we did not notice obvious defects in spindle shape or chromosome alignment in MII oocytes, following acute Cdc42 inhibition with Cdc42T17N (Figs. 1, 3 and 6). However, we cannot exclude the possibility that chromosome attachment to kinetochore microtubules was defective, but remained unnoticed. The integrity of the central spindle in activated oocytes was, however, strongly affected (Fig. 6). Though the molecular basis of this defect is unknown at this time, these data point at a possible role for Cdc42 in promoting central spindle assembly and/or stability in anaphase II. Interestingly, spindle distortion during anaphase II, and a failure to exit meiosis, were also reported in oocytes with decreased cortical tension, consecutive to expression of dominant-negative radixin (Larson et al., 2010). Thus, central spindle distortion in anaphase II could represent a stereotypical response to defective cortical remodeling and unbalanced cortical forces during PB2 emission.

Inhibition of Cdc42 signaling using dominant-negative or constitutively-active Cdc42 mutants, RNA interference or treatment with Toxin B, has previously been shown to decrease the rate of polar body emission during the first meiotic division (Na and Zernicka-Goetz, 2006; Cui et al., 2007; Bielak-Zmijewska et al., 2008). In all these studies however, inhibition was incomplete, as a substantial proportion (30–40%) of oocytes still managed to emit PB1, raising the idea of a compensatory mechanism. In the present study, we confirm the partial inhibitory effect of Cdc42T17N on PB1 emission, possibly due to spindle migration defects (Na and Zernicka-Goetz, 2006). We further show that the remaining oocytes, which succeeded in protruding PB1, could do so in the absence of N-WASP activation at the polarized cortex (Fig. 4). Therefore, the requirement for Cdc42/N-WASP activation is not as stringent during PB1 emission as it is during PB2 emission, and we suggest that an alternative mechanism supports membrane deformation and PB1 protrusion in the absence of Cdc42/N-WASP signaling. It is noteworthy that, contrary to the F-actin cap, the basal cortical F-actin layer is

independent of Cdc42 (this study), N-WASP (Yi et al., 2011) or Arp2/3 activation (Yi et al., 2011; Sun et al., 2011). Therefore, alternative protrusive forces may be provided by actin filaments generated by a machinery other than N-WASP/Arp2/3. The Fmn2-nucleated cytoplasmic actin cables, which drive meiotic spindle migration towards the cortex, have been suggested to generate pushing forces, and therefore could possibly contribute to membrane deformation in anaphase I (Li et al., 2008; Azoury et al., 2011). Fmn2-nucleated actin filaments may also occur at the cortex and participate in PB1 protrusion, since Fmn2 was shown to localize at the oocyte cortex (Azoury et al., 2011). Inflation of the polar body may also be facilitated by elevated hydrostatic pressure in the vicinity of the polar body-forming area, consecutive to elevated acto-myosin contractility during anaphase (Condeelis, 1993; Charras et al., 2005). In contrast, the contribution of other Rho GTPases is unlikely, since PB1 emission can still occur in oocytes treated with toxin B, a broad inhibitor of Rho GTPases (Bielak-Zmijewska et al., 2008). The existence of an alternative mechanism independent of Cdc42/N-WASP is also supported by the work of Dumont et al. (2007), who demonstrated that PB1 emission was unaffected by the inhibition of Ran during meiosis I. According to our model, polarized activation of the Cdc42/N-WASP/F-actin pathway should be absent, or strongly diminished, in these oocytes. Our data suggest however that the lack of Cdc42/N-WASP signaling in activated MII oocytes cannot be compensated for by alternative mechanisms.

In a search for the mechanism coupling spindle positioning to polar body formation in *Xenopus* eggs, Ma et al. (2006) described a localized activation of Cdc42 at the site where the spindle pole interacts with the cortex during meiosis I. This localized activation of Cdc42 was strictly dependent on the perpendicular orientation of the spindle relative to the cortex, and it was suggested that spindle pole-associated proteins may promote Cdc42 activation at the cortex (Zhang et al., 2008). Our data in mouse oocytes contrast with the frog egg model. Firstly, we observed a robust activation of the Cdc42/N-WASP/F-actin pathway in metaphase II-arrested oocytes, where the spindle lies parallel to the cortex. Secondly, we show that the spatial cue for polarized Cdc42 activation is provided by the chromosome-centered Ran-GTP gradient, in a microtubule-independent manner. Thus, amphibian and mammalian oocytes have developed distinct strategies for controlling the polarized activation of Cdc42 necessary for polar body protrusion. Consistent with a Ran-dependent, but microtubule-independent mechanism in mouse oocytes, sperm chromatin, which is not associated with microtubules, is also capable of inducing polarization of the nearby cortex in fertilized mouse oocytes, associated with the protrusion of the so-called fertilization cone (Simerly et al., 1998; Deng and Li, 2009). We speculate that protrusion of the fertilization cone also proceeds via the localized activation of the Cdc42/N-WASP/F-actin pathway, under the control of the Ran-GTP gradient generated by paternal chromatin.

Altogether, the results presented above support a key role for Cdc42 in the molecular cascade leading to mouse oocyte polarization and protrusion of the second polar body. We have shown that Cdc42 is activated in a polarized fashion in the oocyte cortex, under the control of the chromatin-driven Ran-GTP gradient. Cdc42 activation is essential for polarized N-WASP recruitment and the building of the F-actin caps overlying the clusters of meiotic chromosomes or chromatids. The mechanism by which Ran-GTP promotes Cdc42 activation is still elusive at this point, and deserves further investigations. It may involve the release of a cargo protein complexed with importins, and/or the polarized recruitment and activation of a yet-to-be identified Cdc42-GTP/GDP exchange factor.

Acknowledgments

This study was funded by a Medical Research Council Programme Grant to J.C. and a CNRS ATIP fellowship to G.H. G.H. also acknowledges the financial support of Université Rennes 1, Rennes Métropole and Région Bretagne, and the technical support of the BIOSIT UMS 3480 animal facility. We are grateful to William Bement for providing the plasmid encoding EGFP-wGBD.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.01.029>.

References

- Azoury, J., Lee, K.W., Georget, V., Rassinier, P., Leader, B., Verlhac, M.H., 2008. Spindle positioning in mouse oocytes relies on a dynamic meshwork of actin filaments. *Curr. Biol.* 18, 1514–1519.
- Azoury, J., Lee, K.W., Georget, V., Hikal, P., Verlhac, M.H., 2011. Symmetry breaking in mouse oocytes requires transient F-actin meshwork destabilization. *Development* 138, 2903–2908.
- Benink, H.A., Bement, W.M., 2005. Concentric zones of active RhoA and Cdc42 around single cell wounds. *J. Cell Biol.* 168, 429–439.
- Bielak-Zmijewska, A., Kolano, A., Szczepanska, K., Maleszewski, M., Borsuk, E., 2008. Cdc42 protein acts upstream of IQGAP1 and regulates cytokinesis in mouse oocytes and embryos. *Dev. Biol.* 322, 21–32.
- Cannon, J.L., Labno, C.M., Bosco, G., Seth, A., McGavin, M.H., Siminovich, K.A., Rosen, M.K., Burkhardt, J.K., 2001. WASP recruitment to the T cell: APC contact site occurs independently of Cdc42 activation. *Immunity* 15, 249–259.
- Charras, G.T., Yarrow, J.C., Horton, M.A., Mahadevan, L., Mitchison, T.J., 2005. Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature* 435, 365–369.
- Condeelis, J., 1993. Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 411–444.
- Cui, X.S., Li, X.Y., Kim, N.H., 2007. Cdc42 is implicated in polarity during meiotic resumption and blastocyst formation in the mouse. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 785–794.
- Dasso, M., Seki, T., Azuma, Y., Ohba, T., Nishimoto, T., 1994. A mutant form of the Ran/TC4 protein disrupts nuclear function in *Xenopus laevis* egg extracts by inhibiting the RCC1 protein, a regulator of chromosome condensation. *EMBO J.* 13, 5732–5744.
- Deng, M., Suraneni, P., Schultz, R.M., Li, R., 2007. The Ran GTPase mediates chromatin signaling to control cortical polarity during polar body extrusion in mouse oocytes. *Dev. Cell* 12, 301–308.
- Deng, M., Li, R., 2009. Sperm chromatin-induced ectopic polar body extrusion in mouse eggs after ICSI and delayed egg activation. *PLoS One* 4, e7171.
- Duncan, F.E., Moss, S.B., Schultz, R.M., Williams, C.J., 2005. Par-3 defines a central subdomain of the cortical actin cap in mouse eggs. *Dev. Biol.* 280, 38–47.
- Dumont, J., Petri, S., Pellegrin, F., Terret, M.E., Bohnsack, M.T., Rassinier, P., Georget, V., Kalab, P., Gruss, O.J., Verlhac, M.H., 2007. A centriole- and RanGTP-independent spindle assembly pathway in meiosis I of vertebrate oocytes. *J. Cell Biol.* 176, 295–305.
- Halet, G., Tunwell, R., Balla, T., Swann, K., Carroll, J., 2002. The dynamics of plasma membrane PtdIns(4,5)P₂ at fertilization of mouse eggs. *J. Cell Sci.* 115, 2139–2149.
- Halet, G., Carroll, J., 2007. Rac activity is polarized and regulates meiotic spindle stability and anchoring in mammalian oocytes. *Dev. Cell* 12, 309–317.
- Heasman, S.J., Ridley, A.J., 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 690–701.
- Holt, J.E., Jones, K.T., 2009. Control of homologous chromosome division in the mammalian oocyte. *Mol. Hum. Reprod.* 15, 139–147.
- Jégou, A., Pincet, F., Perez, E., Wolf, J.P., Ziyat, A., Gourier, C., 2008. Mapping mouse gamete interaction forces reveal several oocyte membrane regions with different mechanical and adhesive properties. *Langmuir* 24, 1451–1458.
- Kim, S.H., Li, Z., Sacks, D.B., 2000. E-cadherin-mediated cell-cell attachment activates Cdc42. *J. Biol. Chem.* 275, 36999–37005.
- Larson, S.M., Lee, H.J., Hung, P.H., Matthews, L.M., Robinson, D.N., Evans, J.P., 2010. Cortical mechanics and meiosis II completion in mammalian oocytes are mediated by myosin-II and Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) proteins. *Mol. Biol. Cell* 21, 3182–3192.
- Li, H., Guo, F., Rubinstein, B., Li, R., 2008. Actin-driven chromosomal motility leads to symmetry breaking in mammalian meiotic oocytes. *Nat. Cell Biol.* 10, 1301–1308.
- Longo, F.J., Chen, D.Y., 1985. Development of cortical polarity in mouse eggs: involvement of the meiotic apparatus. *Dev. Biol.* 107, 382–394.
- Ma, C., Benink, H.A., Cheng, D., Montplaisir, V., Wang, L., Xi, Y., Zheng, P.P., Bement, W.M., Liu, X.J., 2006. Cdc42 activation couples spindle positioning to first polar body formation in oocyte maturation. *Curr. Biol.* 16, 214–220.

- Maro, B., Johnson, M.H., Webb, M., Flach, G., 1986. Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 92, 11–32.
- Miki, H., Miura, K., Takenawa, T., 1996. N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J.* 15, 5326–5335.
- Na, J., Zernicka-Goetz, M., 2006. Asymmetric positioning and organization of the meiotic spindle of mouse oocytes requires Cdc42 function. *Curr. Biol.* 16, 1249–1254.
- Oceguera-Yanez, F., Kimura, K., Yasuda, S., Higashida, C., Kitamura, T., Hiraoka, Y., Haraguchi, T., Narumiya, S., 2005. Ect2 and MgcRacGAP regulate the activation and function of Cdc42 in mitosis. *J. Cell Biol.* 168, 221–232.
- Padrick, S.B., Rosen, M.K., 2010. Physical mechanisms of signal integration by WASP family proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 707–735.
- Perry, A.C., Veillac, M.H., 2008. Second meiotic arrest and exit in frogs and mice. *EMBO Rep.* 9, 246–251.
- Pfender, S., Kuznetsov, V., Pleiser, S., Kerkhoff, E., Schuh, M., 2011. Spire-type actin nucleators cooperate with Formin-2 to drive asymmetric oocyte division. *Curr. Biol.* 21, 955–960.
- Pollard, T.D., Borisy, G.G., 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453–465.
- Prehoda, K.E., Scott, J.A., Mullins, R.D., Lim, W.A., 2000. Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science* 290, 801–806.
- Rogers, N.T., Halet, G., Piao, Y., Carroll, J., Ko, M.S., Swann, K., 2006. The absence of a Ca^{2+} signal during mouse egg activation can affect parthenogenetic preimplantation development, gene expression patterns, and blastocyst quality. *Reproduction* 132, 45–57.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., Kirschner, M.W., 1999. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97, 221–231.
- Rohatgi, R., Ho, H.Y., Kirschner, M.W., 2000. Mechanism of N-WASP activation by Cdc42 and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Cell Biol.* 150, 1299–1310.
- Sardet, C., Speksnijder, J., Terasaki, M., Chang, P., 1992. Polarity of the ascidian egg cortex before fertilization. *Development* 115, 221–237.
- Schuh, M., Ellenberg, J., 2008. A new model for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Curr. Biol.* 18, 1986–1992.
- Simerly, C., Nowak, G., de Lanerolle, P., Schatten, C., 1998. Differential expression and functions of cortical myosin IIA and IIB isoforms during meiotic maturation, fertilization, and mitosis in mouse oocytes and embryos. *Mol. Biol. Cell* 9, 2509–2525.
- Sun, S.C., Wang, Z.B., Xu, Y.N., Lee, S.E., Cui, X.S., Kim, N.H., 2011. Arp2/3 complex regulates asymmetric division and cytokinesis in mouse oocytes. *PLoS One* 6, e18392.
- Symons, M., Derry, J.M.J., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U., Abo, A., 1996. Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase Cdc42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* 84, 723–734.
- Verlhac, M.H., Lefebvre, C., Guillaud, P., Rassinier, P., Maro, B., 2000. Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Curr. Biol.* 10, 1303–1306.
- Verlhac, M.H., 2011. Spindle positioning: going against the actin flow. *Nat. Cell Biol.* 13, 1183–1185.
- Vinot, S., Le, T., Maro, B., Louvet-Vallée, S., 2004. Two Par6 proteins become asymmetrically localized during establishment of polarity in mouse oocytes. *Curr. Biol.* 14, 520–525.
- Yasuda, S., Oceguera-Yanez, F., Kato, T., Okamoto, M., Yonemura, S., Terada, Y., Ishizaki, T., Narumiya, S., 2004. Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores. *Nature* 428, 767–771.
- Yi, K., Unruh, J.R., Deng, M., Slaughter, B.D., Rubinstein, B., Li, R., 2011. Dynamic maintenance of asymmetric meiotic spindle position through Arp2/3-complex-driven cytoplasmic streaming in mouse oocytes. *Nat. Cell Biol.* 13, 1252–1258.
- Zhang, X., Ma, C., Miller, A.L., Katbi, H.A., Bement, W.M., Liu, X.J., 2008. Polar body emission requires a RhoA contractile ring and Cdc42-mediated membrane protrusion. *Dev. Cell* 15, 386–400.

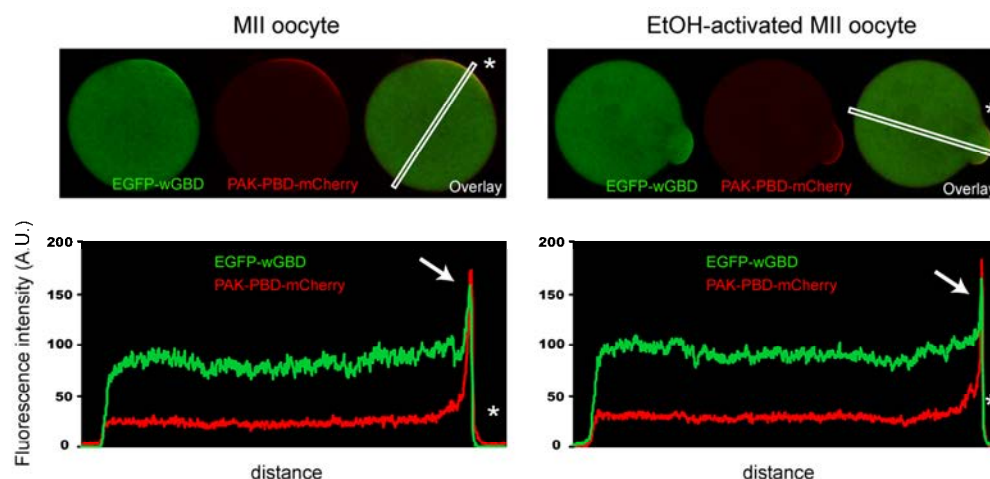


Figure S1 : EGFP-wGBD and PAK-PBD-mCherry co-localize in the polarized cortex.

MII oocytes were injected with cRNA encoding EGFP-wGBD and PAK-PBD-mCherry. Confocal images were acquired in MII oocytes (left panel; $n = 9$) and in EtOH-activated MII oocytes at the time of PB2 protrusion (right panel; $n = 8$). The yellow color indicates co-localization. Fluorescence linescan profiles corresponding to the white boxes are shown. The arrows indicate the co-localization of fluorescence peaks. Asterisks give the orientation of the profiles.

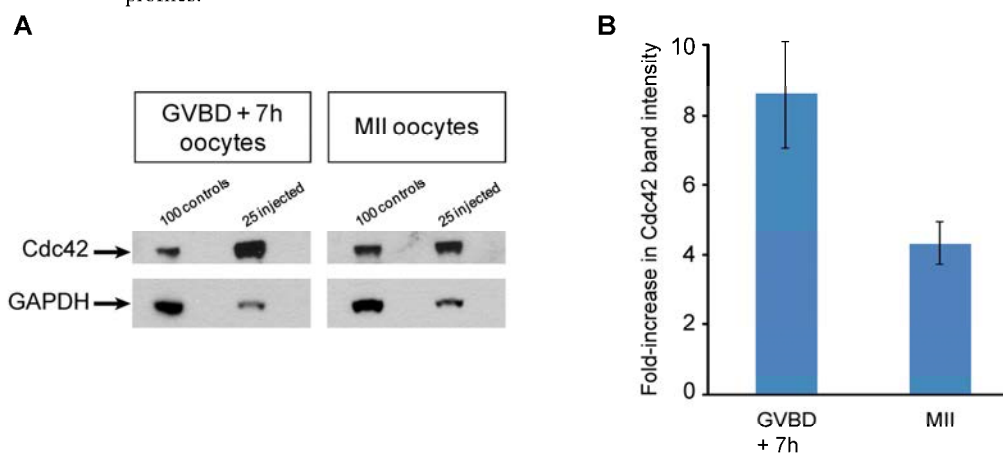


Figure S2 : Quantification of Cdc42T17N expression by Western blot.

(A) Metaphase II oocytes (MII) and GV oocytes were injected with cRNA encoding Cdc42T17N. Lysates were prepared from 25 MII oocytes after three hours of expression (25 injected, right panel), and from 25 oocytes at GVBD + 7h (25 injected, left panel), to match the functional experiments. For controls, lysates were prepared from 100 oocytes in order to increase the reliability of the signal (100 controls). GAPDH detection was used as a loading control, and to normalize the Cdc42 band intensities. A typical experiment is shown ($n = 3$). (B) Bar graph showing the relative increase in Cdc42 band intensity in oocytes expressing Cdc42T17N. The results from three experiments were averaged. GVBD + 7h oocytes : 8.64 ± 1.56 . MII oocytes : 4.33 ± 0.62 .

**Polarized Cdc42 activation promotes polar body protrusion
and asymmetric division in mouse oocytes**

Benoit Dehapiot, Virginie Carrière, John Carroll and Guillaume Halet

SUPPLEMENTARY METHODS

Western blotting

Oocytes were washed twice in PBS supplemented with 1 % polyvinylpyrrolidone (SIGMA), and harvested in 10 µl of sample buffer Laemmli (SIGMA). Lysates were immediately frozen at -80°C for future use. After a 10-minute denaturation at 95°C, samples were subjected to SDS-PAGE using NuPAGE 12% Bis-Tris gels (Life Technologies). The proteins were then transferred to PVDF membranes (GE Healthcare). After transfer, the membranes were blocked with 5% BSA in TBS with 0.1 % Tween-20 for 3 hours, and incubated overnight at 4°C with Cdc42 polyclonal antibody (Cell Signaling # 2462; dilution 1:750) or GAPDH monoclonal antibody (Abcam # ab8245; dilution 1:5000). On day 2, the primary antibodies were washed off and membranes were incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies for one hour at room temperature. Immunoreactive bands were revealed using SuperSignal West Dura Substrate (Thermo Scientific). The density of the bands was quantified using ImageJ software.

Ran GTPase promotes oocyte polarization by regulating ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) inactivation

Benoit Dehapiot and Guillaume Halet*

Institut de Génétique et Développement de Rennes; CNRS UMR 6290; Rennes, France;

Université Rennes 1; UEB; SFR BIOSIT; Rennes, France

Asymmetric meiotic divisions in mammalian oocytes are driven by the eccentric positioning of the spindle, along with a dramatic reorganization of the overlying cortex, including a loss of microvilli and formation of a thick actin cap. Actin polarization relies on a Ran-GTP gradient centered on metaphase chromosomes; however, the downstream signaling cascade is not completely understood. In a recent study, we have shown that Ran promotes actin cap formation via the polarized activation of Cdc42. The related GTPase Rac is also activated in a polarized fashion in the oocyte cortex and co-localizes with active Cdc42. In other cells, microvilli collapse can be triggered by inactivation of the ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) family of actin-membrane crosslinkers under the control of Rac. Accordingly, we show here that Ran-GTP promotes a substantial loss of phosphorylated ERMs in the cortex overlying the spindle in mouse oocytes. However, this polarized phospho-ERM exclusion zone was unaffected by Rac or Cdc42 inhibition. Therefore, we suggest that Ran activates two distinct pathways to regulate actin cap formation and microvilli disassembly in the polarized cortex of mouse oocytes. The possibility of a crosstalk between Rho GTPase and ERM signaling and a role for ERM inactivation in promoting cortical actin dynamics are also discussed.

Keywords: oocyte, meiosis, polarity, GTPase, actin, chromatin

Abbreviations: GV, germinal vesicle; GVBD, germinal vesicle breakdown; MI, metaphase I; MII, metaphase II

Submitted: 04/25/13

Accepted: 05/02/13

<http://dx.doi.org/10.4161/cc.24901>

*Correspondence to: Guillaume Halet;
Email: guillaume.halet@univ-rennes1.fr

Introduction

In mammalian female meiosis, successful haploidization of the maternal genome is

achieved via two successive asymmetric divisions, resulting in the formation of a large oocyte and two small polar bodies that will eventually degenerate. The small size of the polar bodies ensures that minimal amount of maternal organelles and macromolecules (e.g., mRNAs, proteins, mitochondria) are lost in the process.^{1,2} Early embryo viability is thus highly dependent on the establishment of oocyte asymmetry.^{1,2} The key mechanism underlying the asymmetry of oocyte meiotic divisions is the positioning of the meiotic spindle in the vicinity of the cortex.^{3–5} In meiosis I, the spindle forms in the center of the oocyte then moves slowly toward the cortex. At the time of homologous chromosome segregation (metaphase I-anaphase I transition), the spindle has reached a subcortical location, resulting in an asymmetric division and the formation of a small-sized first polar body. This is promptly followed by the formation of the metaphase II spindle, which remains localized in the vicinity of the cortex (Fig. 1). At fertilization, meiosis II resumes, and the activated oocyte emits a small-sized second polar body containing one set of segregated chromatids.

In both meiosis I and II, the asymmetric positioning of the meiotic spindle is accompanied by a range of polarization events, ultimately resulting in the differentiation of a polar body-forming region around the spindle. Thus, cortical granules, which are released upon fertilization to induce the zona-block to polyspermy, redistribute away from the spindle area, resulting in the formation of the so-called

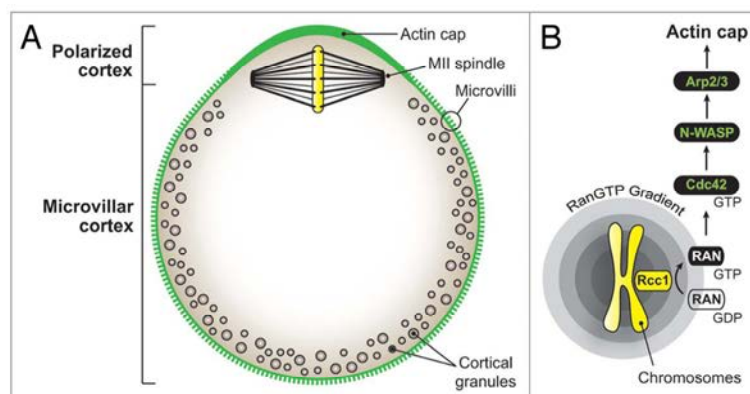


Figure 1. Chromatin-driven polarization in the mammalian oocyte. **(A)** Schematic of the mouse metaphase II (MII) oocyte and its major polarization features. The polarized cortex is defined as the cortical area overlying the MII spindle, devoid of microvilli and cortical granules, and enriched in actin filaments. **(B)** Signaling cascade leading to the formation of the polarized actin cap. RCC1, regulator of chromosome condensation 1.

cortical granule-free domain (Fig. 1).⁶ Another emblematic feature of oocyte polarization is the formation of the “actin cap,” a thick layer of actin filaments that accumulates in the cortex overlying the spindle (Fig. 1).⁷⁻⁹ Interestingly, actin caps are maintained over the chromatin clusters that remain in close apposition with the cortex, after destruction of spindle microtubules with nocodazole.⁷⁻⁹ These observations have led to the concept that oocyte chromatin generates a signal capable of remodeling, from a distance, the nearby cortex. This signal was identified as a gradient of active Ran GTPase (Ran-GTP), which exchange factor RCC1 (regulator of chromosome condensation 1) binds chromatin.¹⁰⁻¹² Ran signaling was shown to promote polarized accumulation of the N-WASP-Arp2/3 machinery in the cortex overlying the spindle, thereby driving the formation of the polarized actin cap.¹³ Recent studies based on live imaging of mouse oocytes have revealed that actin filaments flow continuously away from the cortical cap. This actin flow generates cytoplasmic streaming, which is suggested to apply a directional pushing force on the spindle, thereby maintaining its off-center positioning.¹³⁻¹⁵

In a recent study, we have added a new protagonist, the small GTPase Cdc42, in this signaling cascade. Using a fluorescent

reporter for GTP-bound Cdc42, we have shown that Cdc42 is activated in a polarized fashion in the cortex overlying the meiotic spindle and drives the cortical accumulation of N-WASP and the formation of the actin cap in mouse oocytes.¹⁶ Furthermore, we have shown that this polarized activation of Cdc42 requires the proximity of meiotic chromatin and Ran-GTP signaling.¹⁶ We therefore proposed the following signaling cascade for actin polarization in oocytes (Fig. 1):

Chromatin → Ran-GTP → Cdc42-GTP → N-WASP-Arp2/3 → Actin cap

Our data also suggested that the Ran/Cdc42/N-WASP signaling cascade is conserved during anaphase, promoting the formation of a thick actin layer in the cortex of the polar bodies.¹⁶ Inhibition of Cdc42 signaling resulted in a complete failure of second polar body protrusion in activated MII oocytes, associated with a relocalization of N-WASP to the cytosol.¹⁶ Our current view on these findings is that actin filaments generated via the polarized Cdc42/N-WASP pathway may provide the necessary pushing force to deform the cortex and drive polar body protrusion in a manner similar to actin-driven leading edge extension in motile cells.^{17,18} In a previous study, we presented evidence for a similar polarized activation of the small GTPase Rac in the cortex of mouse oocytes,¹⁹ also under the control of

the Ran-GTP gradient (G.Halet, unpublished observations). At present, it is unclear whether Rac and Cdc42 play complementary or redundant roles in oocyte polarization. Our recent investigations suggest, however, that Cdc42 is the major determinant of N-WASP localization in the mouse oocyte cortex.¹⁶

Another major polarization feature is the loss of membrane microvilli in the polarized cortex (Fig. 1).^{7,8} Microvilli provide binding and fusion sites for the fertilizing sperm,²⁰⁻²² and the rationale for their localized disassembly may be to avoid sperm fusion in the vicinity of the spindle, which could otherwise interfere with spindle function and/or lead to the untimely extrusion of paternal chromatids into the second polar body.²³ The assembly and maintenance of membrane microvilli require proteins of the ERM (Ezrin, Radixin, Moesin) family, which act as membrane-cytoskeleton crosslinkers.^{24,25} ERMs interact with integral membrane proteins via their N-terminal FERM (4.1-Ezrin-Radixin-Moesin) domain and with underlying actin filaments via their C terminus. In their inactive state, ERMs exhibit a “closed” conformation, where the N- and C termini establish an intramolecular or intermolecular association, resulting in mutual inhibition and retention of the protein in the cytosol as a dormant pool. According to the current model, ERM activation requires the initial binding to the phosphoinositide PIP2 via the FERM domain, facilitating the subsequent phosphorylation of a conserved threonine residue at the C terminus (T567 in ezrin, T564 in radixin, T558 in moesin).^{25,26} This phosphorylation stabilizes the active conformation of ERMs (hereafter collectively referred to as phospho-ERMs) and promotes their crosslinking activity.

Mouse oocytes express all three ERM family members and seem to be particularly enriched in radixin.^{27,28} Consistent with a role in microvilli formation, phospho-ERMs are enriched in the oocyte cortex, except for the amicrovillar region overlying the MII spindle.²⁸ These observations suggest that ERM dephosphorylation may be the trigger for microvilli disassembly in the polarized cortex of oocytes, as seen in other cells.²⁹⁻³²

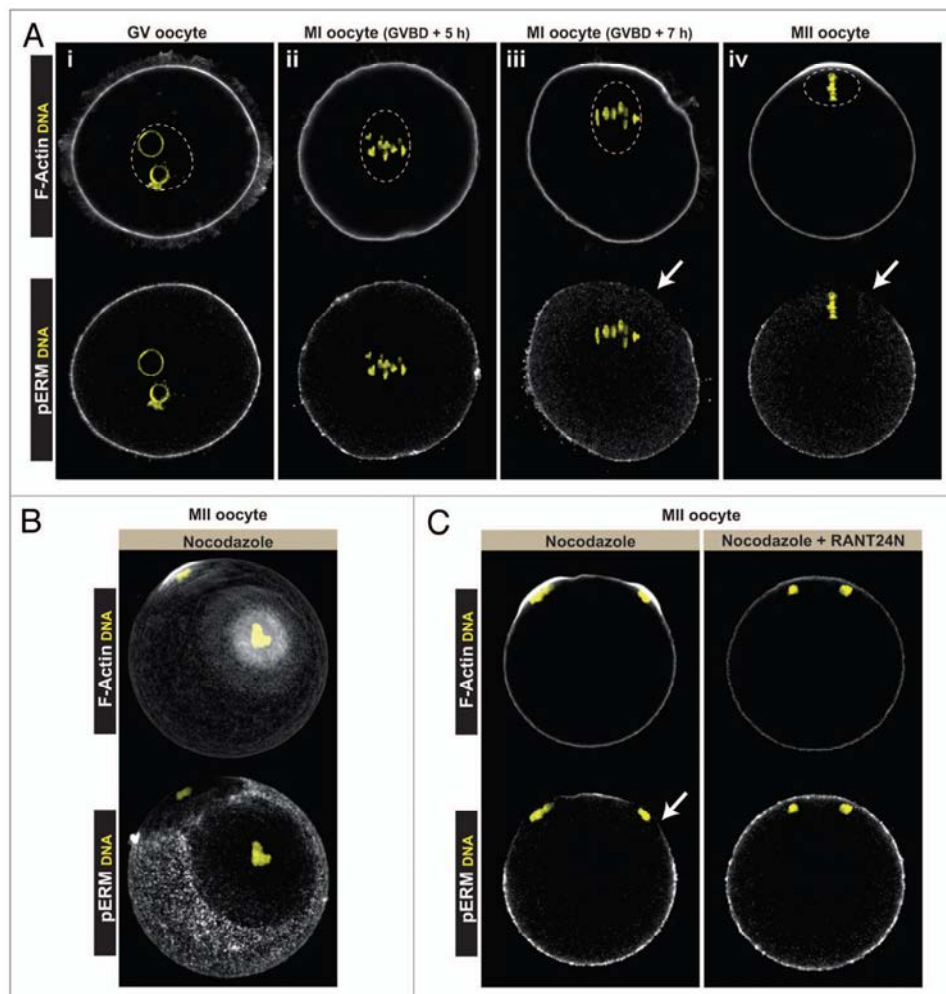


Figure 2. Ran-dependent dephosphorylation of cortical ERMs in the vicinity of oocyte chromatin. **(A)** Actin filaments (F-actin, upper images) and phospho-ERM (pERM, lower images) labeling at successive stages of oocyte meiosis. Note the phospho-ERM exclusion zone (arrows in panels iii and iv) in the cortical regions overlying the late MI (GVBD + 7 h) and MII spindles. The dashed circles indicate the outline of the germinal vesicle (GV, panel i) and meiotic spindles (panels ii–iv). **(B)** MII oocytes were treated with nocodazole (2 μ M) to destroy spindle microtubules. In the oocyte shown, two chromatin clusters have formed, closely apposed to the cortex. Note the polarized actin caps and phospho-ERM exclusion zones overlying each of the clusters. The images are compression of confocal Z-stacks (45 μ m in depth). **(C)** The left panel shows an MII oocyte treated with nocodazole, where the arrow points to the phospho-ERM exclusion zone over a chromatin cluster. The right panel shows a nocodazole-treated MII oocyte overexpressing dominant-negative Rant24N. Note the absence of phospho-ERM exclusion zones in the cortical regions overlying the chromatin clusters. Note also the effective inhibition of actin cap formation over the clusters. Chromatin (labeled with To Pro-3) is shown in yellow.

Interestingly, Rac or Cdc42 activation were shown to promote ERM dephosphorylation and collapse of microvilli in T cells.^{32–35} Thus, one attractive hypothesis is that ERM dephosphorylation in oocytes is triggered by the polarized activation of Rac and/or Cdc42, under the control of the Ran-GTP gradient.

Here, we investigated further the mechanism of mouse oocyte polarization by asking two questions: (1) Does the polarized dephosphorylation of ERM rely on the chromatin-centered Ran-GTP gradient? and (2) Is the polarized phospho-ERM exclusion a downstream event of Rac/Cdc42 activation?

Results and Discussion

Polarization of the mouse oocyte cortex is induced by the proximity of meiotic chromatin, resulting in a graded polarizing response as the distance between the spindle and the cortex shortens.^{10,16} To test whether this is also true for ERM

activation, we examined the pattern of cortical ERM activation at successive stages of oocyte meiosis, using immunolabeling against phospho-ERMs.²⁸ In agreement with a previous report,²⁸ phospho-ERMs and actin filament staining showed a homogenous distribution over the cortex of prophase I-arrested GV oocytes (Fig. 2A, panel i), consistent with the presence of numerous actin-rich microvilli. Metaphase-I oocytes with a centrally located spindle (5 h post-germinal vesicle breakdown/GVBD) exhibited a similar distribution of activated ERMs and actin filaments all over the cortex (Fig. 2A, panel ii). In contrast, at a later stage of metaphase I (GVBD + 7 h), when the spindle apparatus exhibits an eccentric position, the phospho-ERM signal was depleted in the cortical area overlying the spindle (Fig. 2A, panel iii, arrow), along with the appearance of a cortical actin cap. In MII oocytes, phospho-ERMs were detected in the microvillar cortex but were virtually absent from the actin-rich polarized cortex overlying the MII spindle (Fig. 2A, panel iv, arrow). These observations suggest that the meiotic apparatus generates a signal capable of inducing, from a distance, ERM dephosphorylation in the nearby cortex, coincident with the formation of the actin cap. To investigate a possible contribution of spindle microtubules in cortical ERM inactivation, MII oocytes were treated with the microtubule poison nocodazole, which results in the formation of chromatin clusters closely opposed to the cortex.⁷⁻⁹ As shown in Figure 2B, each of the nocodazole-induced chromatin clusters was associated with a localized depletion of phospho-ERM labeling and a reciprocal increase in actin filament polymerization. Thus, similar to the polarization of actin filaments, N-WASP and activated Rac and Cdc42,^{7-10,16,19} ERM dephosphorylation is driven by the proximity of meiotic chromatin in a microtubule-independent manner.

We next examined whether chromatin-induced ERM dephosphorylation was mediated by the Ran-GTP gradient emanating from meiotic chromosomes. MII oocytes treated with nocodazole were injected with cRNA encoding RanT24N, which acts as a dominant-negative version

of the GTPase.^{10,11} Previous work from our and other groups has shown that the Ran-GTP gradient promotes activation of the Cdc42/N-WASP/Arp2/3 cascade to assemble the polarized actin cap.^{13,16} Therefore, disappearance of the polarized actin cap can be used as a validation of effective inhibition of Ran signaling. Interestingly, in addition to the loss of the polarized actin cap, oocytes expressing RanT24N exhibited a uniform distribution of phospho-ERMs at the cortex, including the regions overlying the chromatin clusters (Fig. 2C, right panel). These findings suggest that Ran signaling is necessary for oocyte chromatin to induce ERM dephosphorylation in the nearby cortex.

There is increasing evidence linking Rac activation to ERM dephosphorylation and microvilli collapse in other cells.³²⁻³⁵ Since our previous findings indicate that Rac, and the related GTPase Cdc42, are activated in the cortex overlying oocyte chromatin,^{16,19} we tested if the signaling cascade culminating in ERM dephosphorylation in the polarized cortex involved Rac or Cdc42 activation. MII oocytes were injected with mRNA encoding dominant-negative RacT17N¹⁹ or Cdc42T17N¹⁶ and examined for phospho-ERM and actin filament distribution. Fluorescence profiles were generated along the perimeter of the oocytes to better visualize the changes in fluorescence intensity corresponding to the actin cap and the phospho-ERM exclusion zone. MII oocytes injected with water were used as a control for the polarized phospho-ERM exclusion (Fig. 3A), while oocytes expressing RanT24N were used as a control for effective inhibition of the phospho-ERM exclusion (Fig. 3D). In oocytes expressing RacT17N, the actin cap overlying the MII spindle was preserved, and the polarized inactivation of ERMs remained also unaffected (Fig. 3B). Consistent with our recently published work,¹⁶ Cdc42T17N prevented the assembly of the polarized actin cap in the cortex overlying the MII chromosomes; however, the polarized exclusion of phospho-ERMs was still observed (Fig. 3C). In contrast, overexpression of RanT24N induced a substantial recovery of phospho-ERM staining in the cortex overlying

the MII chromosomes, in conjunction with the expected loss of the actin cap (Fig. 3D). We also tested a constitutively active Rac mutant, Rac1Q61L, which was reported to trigger substantial ERM dephosphorylation and microvilli collapse in other cells.³²⁻³⁵ However, MII oocytes expressing EGFP-Rac1Q61L exhibited a phospho-ERM exclusion zone similar to control oocytes (data not shown).

From the above data, we conclude that the signaling pathway leading to chromatin-induced ERM inactivation in the oocyte cortex is independent of Rac or Cdc42 activation and therefore may represent a separate Ran-dependent signaling cascade (Fig. 4, scenario 1). The mechanism and signaling intermediates leading to polarized ERM inactivation remain to be identified. One possibility is that localized ERM inactivation occurs consecutively to a depletion of the phosphoinositide PIP2, as shown in chemokine-stimulated lymphocytes.³⁶ However, we do not favor this hypothesis, since we have shown previously that PIP2 could still be detected in the membrane region overlying the MII spindle.³⁷ In other cells, ERM phosphorylation is typically counteracted by calyculin A-sensitive phosphatases of the PP1/PP2a families.^{29,31-33,38} Likewise, treatment of oocytes with calyculin A (50 nM for 15 min) prevented the development of the phospho-ERM exclusion zone in the polarized cortex (unpublished observations). This finding suggests that ERM activation in oocytes is dynamically regulated by a balance of kinase and phosphatase activities. Further investigations are needed to find out whether Ran-GTP regulates the kinase activity, the phosphatase activity, or both.

As an alternative to the dual cascade hypothesis, we can also envisage that ERM dephosphorylation lies upstream of the polarized activation of Rac/Cdc42 and actin cap formation (Fig. 4, scenario 2). For instance, through their direct interaction with Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor/RhoGDI, phospho-ERMs have been shown to promote the activation of Rho,^{39,40} which is notoriously antagonistic to Rac/Cdc42.⁴¹⁻⁴³ According to this model, a localized dephosphorylation of ERMs would downregulate Rho activity at the cortex, thus promoting polarized

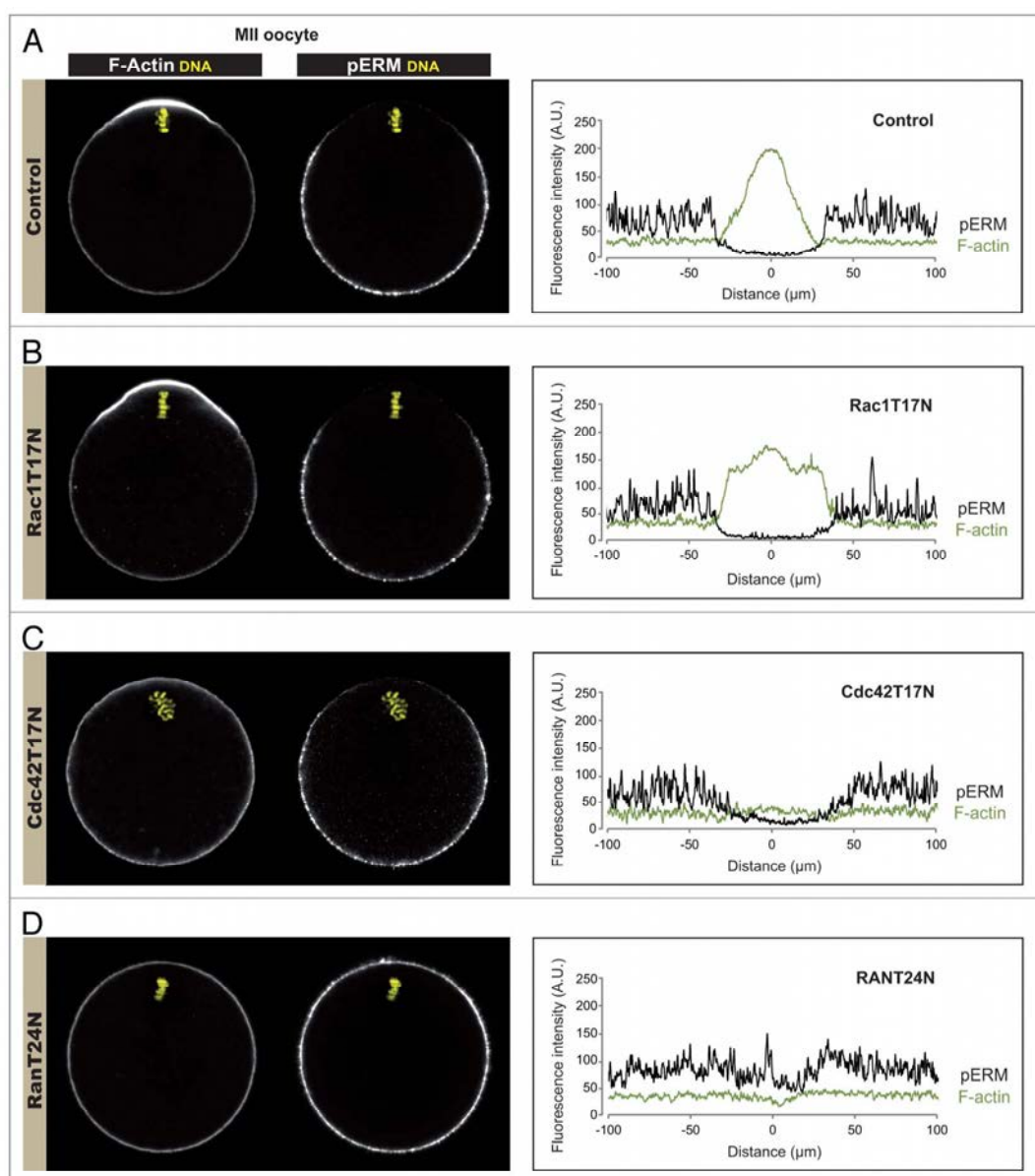


Figure 3. Ran-induced ERM inactivation is independent of Rac and Cdc42 signaling. MII oocytes were injected with water (control, **A**) or with cRNA encoding dominant-negative Rac1T17N (**B**), Cdc42T17N (**C**) or RanT24N (**D**). Confocal images were obtained for actin filament (F-actin) and phospho-ERM (pERM) distribution (left panel), and corresponding fluorescence intensity profiles were generated along the oocyte perimeter (right panel: green line, actin; black line, phospho-ERMs). All fluorescence profiles were centered on the nearest cortical point overlying the metaphase chromosomes (indicated as 0 on the x axis).

Rac/Cdc42 activation. Consistent with this idea, a recent study has shown that radixin depletion promotes Rac activation and cell spreading in cancer cells.⁴⁴

Beyond the formation of an amicrovillar region unfavorable for sperm fusion, ERM inactivation could play additional roles in cortical reorganization and polar

body protrusion. Thus, ERM dephosphorylation, by releasing actin filaments from their anchoring to the overlying membrane, could enable the continuous

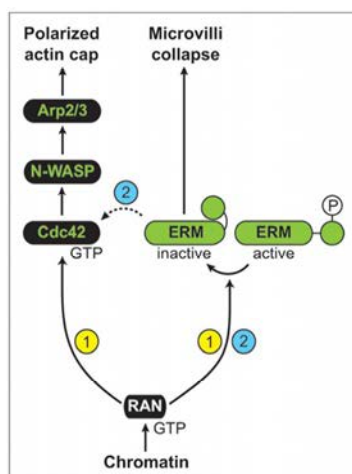


Figure 4. Ran-induced signaling cascades leading to oocyte polarization. Two scenarios are depicted, based on previously published work, and evidence obtained in the present study. In scenario 1, Ran-GTP activates two separate signaling cascades, to promote actin cap formation and the collapse of microvilli in the polarized cortex. The signaling intermediates leading to polarized Cdc42 activation and ERM dephosphorylation are still unknown. In scenario 2, it is suggested that ERM inactivation promotes the polarized activation of Cdc42, in addition to the collapse of microvilli.

cortical actin flow that powers cytoplasmic streaming.¹³ In addition, the polarized inactivation of ERMs may facilitate rapid actin-driven membrane deformation during polar body emission by locally reducing the cortical tension, which would otherwise oppose protrusion.⁴⁵ Consistent with this idea, increasing membrane tension by expression of constitutively active ERMs prevents membrane protrusion in polarizing T cells.^{29,46} In the same way, the overactivation of moesin, by increasing cortical rigidity, interferes with polar relaxation and anaphase elongation in mitotic *Drosophila* cells, resulting in cytokinesis defects.^{38,47} Further investigations to test these possibilities will provide a better picture of the mammalian oocyte polarization mechanism.

Materials and Methods

Oocyte recovery and treatments. All experimental procedures were approved

by the local ethics committee (CREEA). OF-1 mice (8–10-w-old; Charles River) were injected with 7–10 IU PMSG (Sigma) for priming, followed 44–48 h later by 5–7.5 IU hCG (Sigma) to induce ovulation. Germinal vesicle (GV)-stage oocytes were collected from antral follicles and maintained in prophase arrest by supplementing the culture medium (M2 or M16, Sigma) with 250 μ M dibutyryl-cAMP (Sigma). To observe metaphase I progression, oocytes were released from the GV arrest by washing off the dibutyryl-cAMP and cultured in M16 medium in a 5% CO₂ incubator. Metaphase II (MII) oocytes were recovered from the oviducts and denuded of the surrounding cumulus cells by incubation with 300 μ g/ml hyaluronidase (Sigma) in M2 medium, followed by wash. For nocodazole treatment, MII oocytes were incubated in M2 medium containing 2 μ M nocodazole (Calbiochem) for 1.5 h.

Expression of RacT17N, Cdc42T17N, Rac1Q61L and RanT24N. Plasmids encoding Cdc42T17N in pRK5-myc (subsequently subcloned into pcDNA3.1) and EGFP-Rac1Q61L in pcDNA3 were obtained from Gary Bokoch via Addgene (plasmids 12973, 12981). RacT17N in pcDNA3.1 was described previously.¹⁹ RanT24N in pcDNA3.1 was a generous gift from Ben Margolis. After plasmid linearization, cRNAs were prepared in vitro using the mMessage mMachine T7 kit (Life Technologies) and pressure-injected in MII oocytes. Oocytes were allowed to express the mutant GTPase constructs for 3 h before fixation and processing for immunostaining. Control oocytes were injected with an equivalent amount of water.

Immunolabeling. Oocytes were fixed in paraformaldehyde (3.7% in PBS) for 30 min and permeabilized with Triton X100 (0.25% in PBS) for 20 min. After a 3 h incubation in a block solution consisting of 3% BSA in PBS, oocytes were incubated overnight at 4°C with a rabbit monoclonal antibody that recognizes ERMs phosphorylated on the critical C-terminal threonine residue (#3149, Cell Signaling Technology). After three washes, oocytes were incubated with a secondary antibody (Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit IgG, Life Technologies) for 1 h at 37°C.

Staining of actin filaments and chromatin. To label actin filaments, permeabilized oocytes were incubated for 5 min in PBS containing Alexa Fluor 546 Phalloidin (5 units/ml; Life Technologies), followed by wash. Chromatin was labeled with To Pro-3 (5 μ M; Life Technologies).

Confocal imaging and image processing. Oocytes were placed on glass-bottom dishes (MatTek) and imaged using a Leica SP5 confocal microscope equipped with 488, 561 and 633-nm laser lines. Images were processed with ImageJ. All confocal images depicted are representative of at least 20 similar observations. Fluorescence intensity profiles along the oocyte perimeter were generated using the segmented line and plot profile functions in ImageJ. The thickness of the line was 3.5 μ m.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

This work was funded by a CNRS ATIP fellowship to G.H. B.D. is the recipient of a doctoral fellowship from the French Ministry of Research. We are grateful to Ben Margolis for the RanT24N plasmid. We appreciate the technical support from the UMS 3480 BIOSIT animal and microscopy facilities.

References

1. Brunet S, Verlhac MH. Positioning to get out of meiosis: the asymmetry of division. *Hum Reprod Update* 2011; 17:68-75; PMID:20833637; <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmq044>
2. Li R, Albertini DF. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14:141-52; PMID:23429793; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3531>
3. Azoury J, Lee KW, Georget V, Rassinier P, Leader B, Verlhac MH. Spindle positioning in mouse oocytes relies on a dynamic meshwork of actin filaments. *Curr Biol* 2008; 18:1514-9; PMID:18848445; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2008.08.044>
4. Schuh M, Ellenberg J. A new model for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Curr Biol* 2008; 18:1986-92; PMID:19062278; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2008.11.022>
5. Chaigne A, Verlhac MH, Terret ME. Spindle positioning in mammalian oocytes. *Exp Cell Res* 2012; 318:1442-7; PMID:22406266; <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.02.019>
6. Connors SA, Kanatsu-Shinohara M, Schultz RM, Kopf GS. Involvement of the cytoskeleton in the movement of cortical granules during oocyte maturation, and cortical granule anchoring in mouse eggs. *Dev Biol* 1998; 200:103-15; PMID:9698460; <http://dx.doi.org/10.1006/dbio.1998.8945>

7. Longo FJ, Chen DY. Development of cortical polarity in mouse eggs: involvement of the meiotic apparatus. *Dev Biol* 1985; 107:382-94; PMID:4038667; [http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606\(85\)90320-3](http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606(85)90320-3)
8. Maro B, Johnson MH, Webb M, Flach G. Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane. *J Embryol Exp Morphol* 1986; 92:11-32; PMID:3723057
9. Van Blerkom J, Bell H. Regulation of development in the fully grown mouse oocyte: chromosome-mediated temporal and spatial differentiation of the cytoplasm and plasma membrane. *J Embryol Exp Morphol* 1986; 93:213-38; PMID:3734683
10. Deng M, Suraneni P, Schultz RM, Li R. The Ran GTPase mediates chromatin signaling to control cortical polarity during polar body extrusion in mouse oocytes. *Dev Cell* 2007; 12:301-8; PMID:17276346; <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2006.11.008>
11. Dumont J, Petri S, Pellegri F, Terret ME, Bohnsack MT, Rassinier P, et al. A centriole- and RanGTP-independent spindle assembly pathway in meiosis I of vertebrate oocytes. *J Cell Biol* 2007; 176:295-305; PMID:17261848; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200605199>
12. Hao Y, Macara IG. Regulation of chromatin binding by a conformational switch in the tail of the Ran exchange factor RCC1. *J Cell Biol* 2008; 182:827-36; PMID:18762580; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200803110>
13. Yi K, Unruh JR, Deng M, Slaughter BD, Rubinstein B, Li R. Dynamic maintenance of asymmetric meiotic spindle position through Arp2/3-complex-driven cytoplasmic streaming in mouse oocytes. *Nat Cell Biol* 2011; 13:1252-8; PMID:21874009; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2320>
14. Yi K, Li R. Actin cytoskeleton in cell polarity and asymmetric division during mouse oocyte maturation. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2012; 69:727-37; PMID:22753278; <http://dx.doi.org/10.1002/cm.21048>
15. Yi K, Rubinstein B, Unruh JR, Guo F, Slaughter BD, Li R. Sequential actin-based pushing forces drive meiosis I chromosome migration and symmetry breaking in oocytes. *J Cell Biol* 2013; 200:567-76; PMID:23439682; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201211068>
16. Dehapiot B, Carrière V, Carroll J, Halet G. Polarized Cdc42 activation promotes polar body protrusion and asymmetric division in mouse oocytes. *Dev Biol* 2013; 377:202-12; PMID:23384564; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbiol.2013.01.029>
17. Condeelis J. Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9:411-44; PMID:8280467; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cb.09.110193.002211>
18. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 2003; 112:453-65; PMID:12600310; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00120-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00120-X)
19. Halet G, Carroll J. Rac activity is polarized and regulates meiotic spindle stability and anchoring in mammalian oocytes. *Dev Cell* 2007; 12:309-17; PMID:17276347; <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2006.12.010>
20. Yanagimachi R. Sperm-egg association in animals. *Curr Top Dev Biol* 1978; 12:83-105; PMID:352627; [http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)60594-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60594-3)
21. Runge KE, Evans JE, He ZY, Gupta S, McDonald KL, Stahlberg H, et al. Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Dev Biol* 2007; 304:317-25; PMID:17339847; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbiol.2006.12.041>
22. Jégou A, Ziyat A, Barraud-Lange V, Perez E, Wolf JP, Pincet F, et al. CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:10946-51; PMID:21690351; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1017400108>
23. Luo J, McGinnis LK, Kinsey WH. Fyn kinase activity is required for normal organization and functional polarity of the mouse oocyte cortex. *Mol Reprod Dev* 2009; 76:819-31; PMID:19363790; <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.21034>
24. Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Direct involvement of ezrin/radixin/moesin (ERM)-binding membrane proteins in the organization of microvilli in collaboration with activated ERM proteins. *J Cell Biol* 1999; 145:1497-509; PMID:10385528; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.145.7.1497>
25. Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11:276-87; PMID:20308985; <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2866>
26. Fievet BT, Gautreau A, Roy C, Del Maestro L, Mangeat P, Louvard D, et al. Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J Cell Biol* 2004; 164:653-9; PMID:14993232; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200307032>
27. Louver S, Aghion J, Santa-Maria A, Mangeat P, Maro B. Ezrin becomes restricted to outer cells following asymmetrical division in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 1996; 177:568-79; PMID:8806832; <http://dx.doi.org/10.1006/dbio.1996.0186>
28. Larson SM, Lee HJ, Hung PH, Matthews LM, Robinson DN, Evans JP. Cortical mechanics and meiosis II completion in mammalian oocytes are mediated by myosin-II and Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) proteins. *Mol Biol Cell* 2010; 21:3182-92; PMID:20660156; <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E10-01-0066>
29. Brown MJ, Nijhara R, Hallam JA, Gignac M, Yamada KM, Erlandsen SL, et al. Chemokine stimulation of human peripheral blood T lymphocytes induces rapid dephosphorylation of ERM proteins, which facilitates loss of microvilli and polarization. *Blood* 2003; 102:3890-9; PMID:12907449; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-12-3807>
30. Chen J, Cohn JA, Mandel LJ. Dephosphorylation of ezrin as an early event in renal microvillar breakdown and anoxic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7495-9; PMID:7638219; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.16.7495>
31. Kondo T, Takeuchi K, Doi Y, Yonemura S, Nagata S, Tsukita S. ERM (ezrin/radixin/moesin)-based molecular mechanism of microvillar breakdown at an early stage of apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 139:749-58; PMID:9348291; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.139.3.749>
32. Nijhara R, van Hennik PB, Gignac ML, Kruhlak MJ, Hordijk PL, Delon J, et al. Rac1 mediates collapse of microvilli on chemokine-activated T lymphocytes. *J Immunol* 2004; 173:4985-93; PMID:15470041
33. Faure S, Salazar-Fontana LI, Semichon M, Tybulewicz VJ, Bismuth G, Trautmann A, et al. ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nat Immunol* 2004; 5:272-9; PMID:14758359; <http://dx.doi.org/10.1038/ni1039>
34. Rossy J, Gutjahr MC, Blaser N, Schlicht D, Niggli V. Ezrin/moesin in motile Walker 256 carcinoma cells: signal-dependent relocalization and role in migration. *Exp Cell Res* 2007; 313:1106-20; PMID:17292355; <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.12.023>
35. Cernuda-Morollón E, Millán J, Shipman M, Marelli-Berg FM, Ridley AJ. Rac activation by the T-cell receptor inhibits T cell migration. *PLoS ONE* 2010; 5:e12393; PMID:20811629; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012393>
36. Hao JJ, Liu Y, Kruhlak M, Debel KE, Rellahan BL, Shaw S. Phospholipase C-mediated hydrolysis of PIP2 releases ERM proteins from lymphocyte membrane. *J Cell Biol* 2009; 184:451-62; PMID:19204146; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200807047>
37. Halet G, Tunwell R, Balla T, Swann K, Carroll J. The dynamics of plasma membrane PtdIns(4,5)P(2) at fertilization of mouse eggs. *J Cell Sci* 2002; 115:2139-49; PMID:11973355
38. Roubinet C, Decelle B, Chicanne G, Dorn JF, Payastre B, Payre F, et al. Molecular networks linked by Moesin drive remodeling of the cell cortex during mitosis. *J Cell Biol* 2011; 195:99-112; PMID:21969469; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201106048>
39. Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A, Takaishi K, Kameyama T, Tsukita S, et al. Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem* 1997; 272:23371-5; PMID:9287351; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.37.23371>
40. Hamada K, Seto A, Shimizu T, Matsui T, Takai Y, Tsukita S, et al. Crystallization and preliminary crystallographic studies of RhoGDI in complex with the radixin FERM domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2001; 57:889-90; PMID:11375519; <http://dx.doi.org/10.1107/S090744490100556X>
41. Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Collard JG. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* 1999; 147:1009-22; PMID:10579721; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.147.5.1009>
42. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002; 420:629-35; PMID:12478284; <http://dx.doi.org/10.1038/nature01148>
43. Vaughan EM, Miller AL, Yu HY, Bement WM. Control of local Rho GTPase crosstalk by Abr. *Curr Biol* 2011; 21:270-7; PMID:21295482; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.01.014>
44. Valderrama F, Thevapala S, Ridley AJ. Radixin regulates cell migration and cell-cell adhesion through Rac1. *J Cell Sci* 2012; 125:3310-9; PMID:22467863; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.094383>
45. Raucher D, Sheetz MP. Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J Cell Biol* 2000; 148:127-36; PMID:10629223; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.148.1.127>
46. Liu Y, Belkina NV, Park C, Nambiar R, Loughhead SM, Patino-Lopez G, et al. Constitutively active ezrin increases membrane tension, slows migration, and impedes endothelial transmigration of lymphocytes in vivo in mice. *Blood* 2012; 119:445-53; PMID:22106344; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-07-368860>
47. Kunda P, Rodrigues NTL, Moenendarbary E, Liu T, Ivetic A, Charras G, et al. PPI-mediated moesin dephosphorylation couples polar relaxation to mitotic exit. *Curr Biol* 2012; 22:231-6; PMID:22209527; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.12.016>

B. Rôles et régulation de l'acto-myosine corticale lors de la deuxième division méiotique de l'ovocyte de souris

1. Problématique

Au stade métaphase II (MII), le fuseau méiotique de l'ovocyte de souris se positionne de manière asymétrique et présente une orientation parallèle au cortex cellulaire. Suite à la fécondation et au déclenchement de l'anaphase II (AII), le fuseau opère une rotation selon son axe transversal afin de se réorienter perpendiculairement au cortex. Cette rotation est nécessaire à l'émission du deuxième globule polaire (2^{ème} GP), et constitue donc l'une des étapes essentielles au bon déroulement de la méiose ovocytaire chez la souris. Récemment, différentes études ont permis de mieux comprendre les mécanismes régulant le positionnement du fuseau méiotique au sein de ce modèle, notamment lors de la migration du fuseau de MI (Azoury et al, 2008 ; Schuh and Ellenberg, 2008 ; Yi et al, 2013 ; Chaigne et al, 2013), ou le maintien de la localisation asymétrique du fuseau de MII (Yi K et al, 2011). Cependant, le mécanisme permettant la rotation du fuseau demeure quant à lui largement méconnu et n'a encore jamais été décrit d'un point de vue dynamique.

Comme bon nombre de processus cellulaires, notamment dans l'ovocyte de souris, la rotation du fuseau méiotique est dépendante du cytosquelette d'acto-myosine. En effet différentes études ont démontré l'importance de la polymérisation des filaments d'actine et de l'activation de la myosine 2 au cours de ce processus (Zhu ZY et al, 2003 ; Matson S et al, 2006 ; Wang Q et al, 2011 ; Zhong ZS et al, 2005). Lors de la MII, l'ovocyte présente une polarisation corticale de l'acto-myosine qui se caractérise par un dôme d'actine entouré d'un anneau de myosine 2 activé (phosphorylation de la chaîne légère sur la sérine 19). Ces deux événements de polarisation sont dépendants du gradient de Ran-GTP émanant des chromosomes (Deng et al, 2007). Selon le modèle actuel, l'anneau de myosine 2 s'assemble en préalable à la formation de l'anneau de cytodérèse qui sera nécessaire à l'émission du 2^{ème} GP (Yi and Li, 2012). Cette configuration d'éléments rappelle, en effet, la mise en place de la polarité corticale lors de l'émission du 1^{er} GP dans l'ovocyte de *X. laevis*. Lors de ce processus, la GTPase RhoA activé (RhoA-GTP) se localise au niveau d'un anneau de cytodérèse d'acto-myosine se contractant à la base d'un dôme polarisé de filaments d'actine (Ma et al, 2006 ; Zhang et al, 2008). Cependant, la présence de l'anneau de myosine dès la MII chez la souris suggère un découplage entre

la formation de l'anneau de cytotérière et sa constriction lors de l'émission du 2^{ème} GP (Yi and Li, 2012). La localisation et la régulation de l'activité de la GTPase RhoA, bien que nécessaires à l'émission des deux globules polaires, restent à déterminer au sein de l'ovocyte de souris (Elbaz J et al, 2009 ; Zhong ZS et al, 2005).

2. Résultats

L'activation parthénogénétique à l'éthanol d'ovocytes MII exprimant les sondes EGFP-MAP4 (microtubules) et H2b-mCherry (ADN) nous a permis de suivre le processus de rotation du fuseau de All par imagerie confocale au cours du temps (Fig. 1A). Suite au déclenchement de l'anaphase, une ingression du cortex ovocytaire intervient en regard de la région centrale du fuseau et laisse apparaître une protrusion membranaire au-dessus de chacun des deux lots de chromatides en cours de ségrégation (Fig. 1A, t=20min). Durant cette phase, le fuseau demeure parallèle au cortex et aucun signe évident d'asymétrie n'est observable autour de l'axe de séparation des chromatides. Cette situation prend fin par la rotation progressive du fuseau intervenant autour de l'axe d'ingression à partir de t=25min (Fig. 1A, panneau inférieur). La fermeture du globule polaire nécessite alors l'ingression du cortex opposé (voir flèches) et s'accompagne de la rétraction de la protrusion membranaire surplombant le lot de chromatides internalisé dans l'ovocyte (Fig. 1A, panneau inférieur, t= 40-45min).

La programmation d'un logiciel d'analyse d'image nous a permis de décrire la rotation du fuseau de manière quantitative et systématique. Pour cela, nous avons suivi de manière automatique les deux lots de chromatides et interprété leur axe de séparation comme l'orientation longitudinale du fuseau en trois dimensions. La mesure de l'angle α (Fig. 1B) nous a permis de quantifier la rotation du fuseau et de fournir une analyse représentative de 40 ovocytes (Fig. 1C et 1D). La dynamique de séparation des chromatides au sein de la population d'ovocyte testés se révèle être fortement homogène (Fig. 1C, graphique du haut). En revanche, les ovocytes présentent de fortes disparités en ce qui concerne la dynamique de rotation du fuseau. Pour représenter ces disparités, nous avons décidé de délimiter arbitrairement la période de rotation entre le premier et le dernier instant où la variation de l'angle α dépasse 25% de la variation maximum enregistrée. Nous avons ensuite subdivisé notre population d'ovocytes en trois groupes distincts définis en fonction du temps initial de rotation (Fig. 1C, graphique du bas). Cette méthode pour définir la rotation nous a également permis de mesurer

différents paramètres moyens de ce processus tels que l'angle total de rotation ($59,3^{\circ} \pm 11,5^{\circ}$), le temps total de rotation ($35,5\text{min} \pm 13,4$) et la vitesse de rotation ($1,84^{\circ}.\text{min}^{-1} \pm 0,59$) (Fig. 1D).

Nous avons ensuite étudié la localisation de l'acto-myosine corticale au cours du processus de rotation du fuseau méiotique. Pour cela nous avons activé et fixé des ovocytes à différents stades de ce processus. En MII, les filaments d'actine, visualisés grâce à de la phalloïdine couplée à un fluorophore, se localisent sous la forme d'un dôme d'actine polarisé dans la région du cortex surplombant le fuseau. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée (Ser19) de la chaîne légère de la myosine 2 (pMLC2) nous a permis de révéler la localisation de la myosine 2 activée sous la forme d'un anneau entourant le dôme d'actine (Fig. 2A). A un stade précoce de l'anaphase II, deux dômes d'actine, de taille plus réduite, accompagnent les deux lots de chromatides en cours de séparation. Chacun d'entre eux est entouré par un anneau de myosine 2 (Fig. 2B). De manière intéressante, nous pouvons noter l'apparition d'une accumulation d'actine et d'une nouvelle population de myosine 2 dans la région d'ingression centrale du cortex ovocytaire (voir flèches). A un stade plus tardif de l'anaphase II, qui se caractérise par la rotation du fuseau, la polarisation de l'acto-myosine reste identique à l'exception du cortex surplombant le lot de chromatines internalisé dans l'ovocyte (Fig. 2C). En effet, à cet endroit la polarisation de l'actine diminue et l'anneau de myosine 2 se transforme en dôme (voir flèches). Nous avons également représenté la localisation de l'acto-myosine, aux différents stades précédemment cités, sous forme de profils d'intensité de fluorescence corticale (Fig. 2D). L'ensemble de ces observations mettent en évidence l'existence de deux sous-populations de myosine 2 corticale, l'une étant associée aux chromatides et l'autre à l'ingression du cortex ovocytaire.

RhoA est connue pour être nécessaire à la contraction de l'anneau de cytotérière lors des divisions mitotiques et méiotiques (Piekny et al, 2005 ; Bement et al, 2005 ; Zhong ZS et al, 2005 ; Liu, 2012). A l'aide d'un anticorps spécifique, nous avons suivi la localisation de cette GTPase au cours de l'émission du 2^{ème} GP (Fig. 3A). Dans l'ovocyte MII, le marquage RhoA est diffus et ne présente aucun signe de localisation corticale. En revanche, lors de l'anaphase II, RhoA se localise de manière très intense au niveau de l'ingression centrale du cortex ovocytaire. Une projection en Z du marquage révèle que RhoA se présente à ce stade sous la forme d'un « demi-anneau » entre les deux lots de chromatides en cours de ségrégation. Cette localisation de RhoA en anaphase II est tout à fait atypique et diffère fortement de celle que la GTPase connaît lors de l'anaphase I (Fig. 3B). Nous avons ensuite mis en évidence la localisation du facteur d'échange (GEF) Ect2 au niveau du fuseau central (Fig. 3C). Une telle localisation d'Ect2 lors de la cytotérière est connue pour être nécessaire à l'activation de RhoA (Saito

et al, 2004) et pour être dépendante de l'activité kinase de Plk1 (Petronczki et al, 2007). Afin de tester l'influence de la voie Ect2/RhoA sur l'ingression du cortex ovocytaire, la rotation du fuseau et l'émission du 2^{ème} GP, nous avons inhibé d'une part, l'activité kinase de Plk1 par le Bi-2536, et inhibé d'autre part, les GTPases de type RhoA, B et C par la C3-transférase (Fig. 3D). Dans chacun des cas, les ovocytes traités présentent une perte du marquage RhoA et une inhibition de l'ingression du cortex ovocytaire. Ceci se traduit par absence de rotation du fuseau et une baisse importante du taux d'émission du 2^{ème} GP : 82% d'émission pour les ovocytes contrôles, 16% pour les ovocytes C3-transférase et 3% pour les ovocytes Bi-2536 (Fig. 3D). Ces expériences nous permettent d'établir un lien entre l'ingression du cortex ovocytaire, dépendante de la voie Ect2/RhoA, et le processus de rotation du fuseau nécessaire à l'émission du 2^{ème} GP.

Lors de la division cellulaire, la kinase ROCK et l'Anilline agissent en aval de RhoA pour respectivement favoriser l'activation de la myosine 2 et organiser l'anneau de cytotérière (Fededa JP and Gerlich DW, 2012 ; Piekny and Glotzer, 2007). Des immuno-marquages, réalisés en anaphase II, nous révèlent une localisation de ces deux protéines au niveau de l'ingression centrale du cortex ovocytaire (Fig. 4A, voir flèche). Ces observations suggèrent que la sous-population de myosine 2, associée à l'ingression (voir Fig. 2B, pMLC2 flèche), participe à la contraction de l'anneau de cytotérière lors de l'émission du 2^{ème} GP. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons traité les ovocytes par un inhibiteur de l'activité kinase de ROCK (Y-27632) (Amano M et al, 2010). La présence de cet inhibiteur entraîne un défaut de rotation du fuseau et une baisse du taux d'émission du 2^{ème} GP dans les ovocytes activés : 87% d'émission pour les ovocytes contrôles, 11% pour les ovocytes Y-27632 (Fig. 4B). En anaphase II, cette inhibition se traduit par une absence de l'ingression corticale et une perte du marquage myosine 2 associé (Fig. 4C). En revanche, les anneaux de myosine 2 surplombant les chromatides sont conservés. Nous avons ensuite incubé, de manière prolongée ($t > 2h$), des ovocytes MII en présence de Y27632 (Fig. 4D). Dans la majorité des cas, nous avons observé un maintien de la polarisation de l'acto-myosine avec toutefois, une tendance de la myosine à se relocaliser en dôme. L'injection d'une forme dominante négative de Ran (RANT24N) ou de Cdc42 (Cdc42T17N) nous a par contre permis de supprimer entièrement cette polarisation (Fig. 4D). L'ensemble de ces résultats suggèrent une régulation différentielle de la mise en place des deux sous-populations de myosine 2 corticale observées lors de l'anaphase II. Les anneaux de myosine 2 surplombant les chromatides sont dépendants de la voie Ran/Cdc42, tandis que la myosine 2 associée à l'ingression du cortex ovocytaire dépend de la voie Ect2/RhoA/ROCK. Cette deuxième sous-population est nécessaire à l'ingression du cortex, à la rotation du fuseau et à l'émission du 2^{ème} GP.

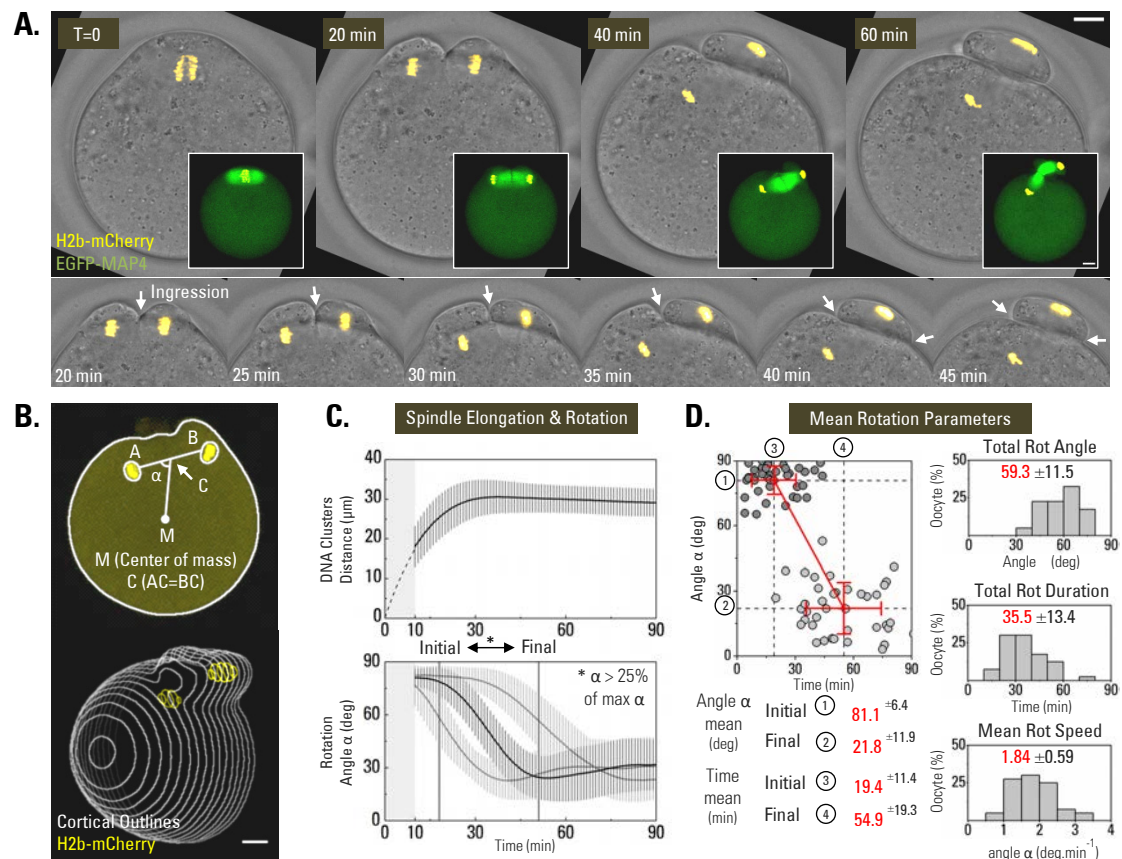


Figure 1 : Rotation du fuseau et émission du deuxième globule polaire.

A. Suivi au cours du temps par imagerie confocale de la rotation du fuseau dans des ovocytes vivants activés à l'éthanol 7%-8min ($t=0$) exprimant H2b-mCherry (ADN en jaune) seul (champ clair) ou H2b-mCherry et EGFP-MAP4 (microtubules en vert) (encarts). Le panneau inférieur permet d'observer ce même phénomène à intervalle de temps plus rapproché. Les flèches blanches représentent la direction des ingressions membranaires accompagnant l'émission du 2^{ème} GP. Barres d'échelles = 10 μ m. **B.** Image du haut : représentation schématique de l'angle α défini par l'angle d'intersection entre la droite reliant les deux chromatides (AB) et la droite passant par le centre de AB (C) et le centre de masse de l'ovocyte (M). Les coordonnées tridimensionnelles (x, y, z) des deux lots de chromatides sont obtenues au moyen d'un programme de reconnaissance automatique fonctionnant sur MATLAB. Le centre de masse est calculé à partir du fond de fluorescence résultant de l'expression de H2b-mCherry par les ovocytes. Image du bas : projection en Z de 20 plans confocaux (intervalle de 3.19 μ m) résultant de la numérisation d'un ovocyte lors de la rotation du fuseau. La périphérie membranaire est représentée en blanc et les chromosomes sont représentés en jaune. Ce type d'acquisition a été réalisée toutes les 2min pour fournir une vision dynamique et quantifiable de la rotation. Barre d'échelle = 10 μ m. **C.** Graphiques représentant l'évolution moyenne de la distance entre les deux masses de chromatides (A et B) (graphique du haut) et l'évolution moyennes au cours du temps de l'angle α (graphique du bas) ($n=40$ ovocytes). Les ovocytes ont été alignés en fonction de l'estimation (extrapolation à la polynomiale d'ordre 4) du temps pour lequel la distance entre les lots de chromatides = 0 μ m (ligne pointillée, graphique du haut). Pour l'évolution de l'angle α et par soucis d'une meilleure représentativité, la population d'ovocytes a été subdivisée en trois groupes en fonction du temps initial de rotation du fuseau (de gauche à droite, $n=13, 14$ et 13). La proximité entre les lots de chromatides au début de l'anaphase ne permet pas d'obtenir de données pertinentes dans les dix premières minutes de ce processus (zone grisée à gauche sur les graphiques). Les courbes de chaque ovocyte ont été lissées par la méthode de Savitzky-Golay (fenêtre de lissage = 10min, ordre polynomial = 4). **D.** Représentation des différents paramètres de la rotation du fuseau sur une population de 40 ovocytes. Les paramètres initial et final de la rotation ont été définis sur la période de rotation où la vitesse de variation de l'angle α est supérieure à 25% de la vitesse maximale.

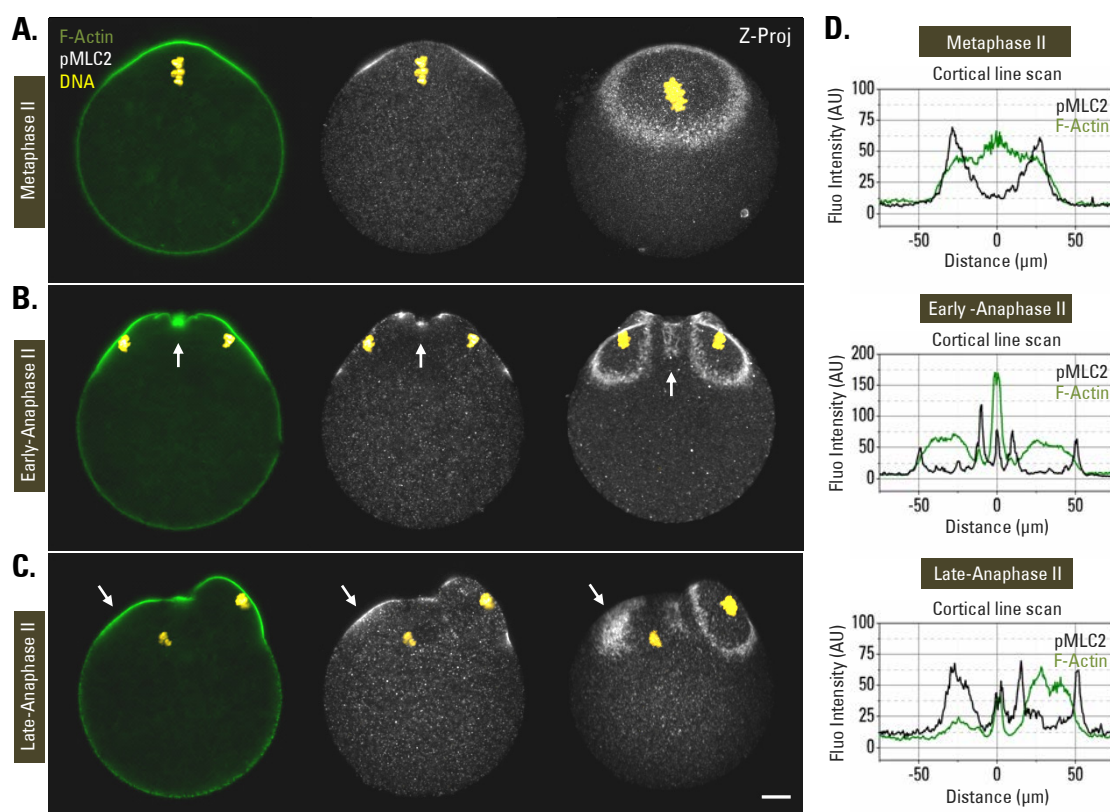


Figure 2 : Localisation corticale du réseau d'acto-myosine

Les ovocytes sont activés à l'éthanol 7%-8min (sauf MII), fixés par 3,5% de PFA et incubés en présence de phalloïdine couplée à l'Alexa Fluor® (F-Actin en vert), d'un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée (Ser19) de la chaîne légère de la myosine 2 (pMLC2 en blanc) (CellSignaling® 3671) et de TO-PRO®-3 (ADN en jaune). Les images ont été acquises par microscopie confocale sur une épaisseur en Z de 1μm, sauf pour les images situées à droite des panneaux où une projection en Z de 40 plans confocaux a été réalisée (intervalle de 1μm). Barre d'échelle = 10μm. **A.** Ovocyte MII : le fuseau méiotique est surplombé d'un dôme cortical de filaments d'actine entouré par un anneau de myosine 2. **B.** Ovocyte en Anaphase II (t ~20min post-activation) : deux dômes d'actine, chacun entouré d'un anneau de myosine 2, accompagnent les deux lots de chromatides en cours de séparation. A noter également une accumulation d'actine et de myosine 2 dans la région d'ingression centrale du cortex ovocytaire (voir flèches blanches). **C.** Ovocyte en Anaphase II (t ~40min post-activation) : modification de la polarité de l'acto-myosine dans la région corticale surplombant le lot de chromatides internalisé dans l'ovocyte : baisse de l'intensité de la polarisation d'actine et relocalisation en dôme de la myosine (voir flèches blanches). **D.** Profils d'intensité de fluorescence corticale représentant la polarisation de l'acto-myosine aux différents stades étudiés (F-Actin en vert et pMLC2 en noir). Chacun des profils est réalisé par segmentation automatique d'un seul ovocyte sous ImageJ (largeur du profil ~ 5μm). Les caractéristiques décrites du réseau d'acto-myosine corticale aux différents stades étudiés sont observées de manière systématique (n>100).

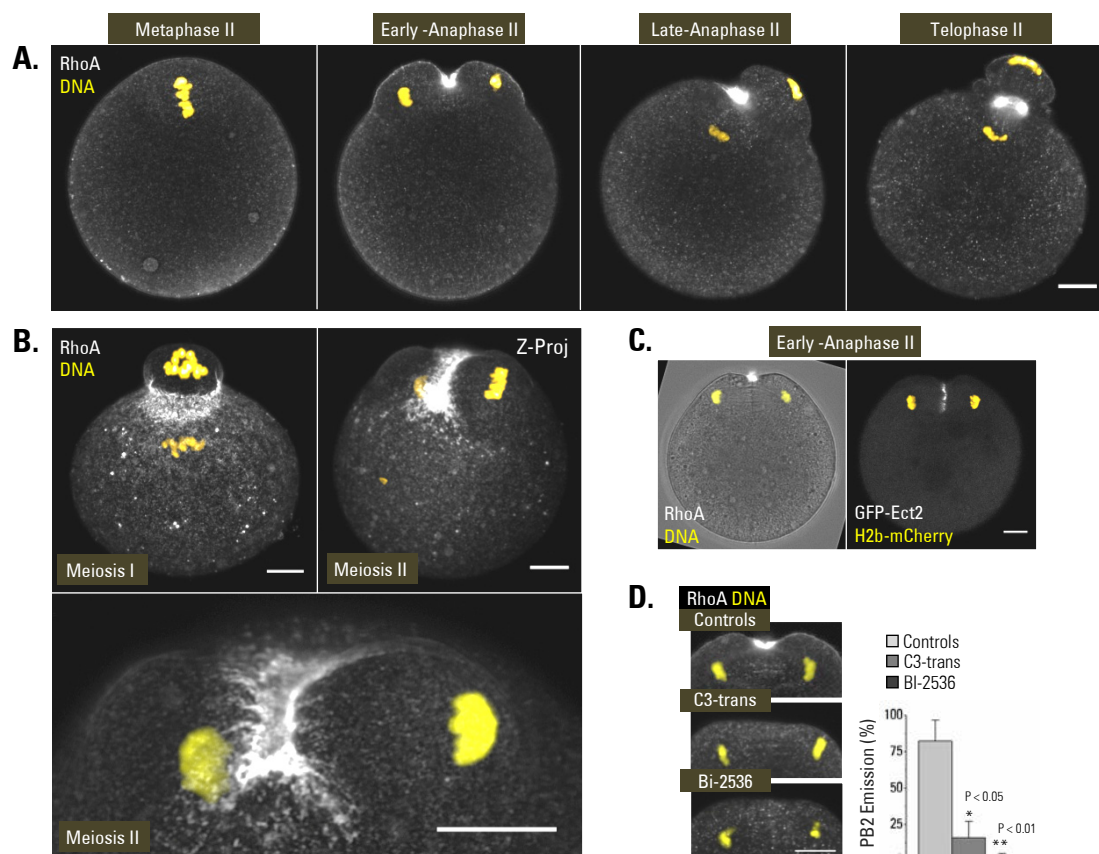


Figure 3 : Localisation de la GTPase RhoA

Les ovocytes sont activés à l'éthanol 7%-8min (sauf MII), fixés par 10% de TCA, et incubés en présence d'un anticorps dirigé contre la GTPase RhoA (en blanc) (SantaCruz® sc-418) et de TO-PRO®-3 (ADN en jaune) (sauf GFP-Ect2N et H2b-mCherry). Les images ont été acquises par microscopie confocale sur une épaisseur en Z de 1µm. Barre d'échelle = 10µm. **A.** Le marquage cortical de RhoA apparaît suite au déclenchement de l'anaphase II et persiste au niveau de l'ingression du cortex ovocytaire jusqu'à l'émission du 2^{ème} GP. **B.** Comparaison de la localisation de RhoA lors de l'anaphase I et l'anaphase II. Les images représentent une projection en Z de 40 plans confocaux (intervalle de 1µm). **C.** Image de gauche : localisation de RhoA en regard du fuseau central visible en champ clair. Image de droite : localisation dans un ovocyte vivant de la protéine de fusion GFP-Ect2 (souris) au niveau du fuseau central. **D.** Influence de l'inhibition de la voie Ect2/RhoA sur le déroulement de la deuxième division méiotique. Les ovocytes sont injectés par de la C3-transférase en solution à 1µg/µl (30min avant activation), ou traités par le Bi-2536 à 250nM (post-activation). Dans les deux cas, l'inhibition de la voie Ect2/RhoA entraîne une perte de l'ingression corticale et une délocalisation de RhoA. Taux d'émission du 2^{ème} GP 2h après l'activation : contrôles 82% n=81, C3-trans 16% n=101, et Bi-2536 3% n=105. Les barres d'erreurs représentent la variation standard de 3 expériences indépendantes. Les différences statistiques entre les ovocytes contrôles et les ovocytes traités ont été évaluées par un test de Student. La localisation de RhoA au niveau de l'ingression centrale du cortex est observée de manière systématique (n>100).

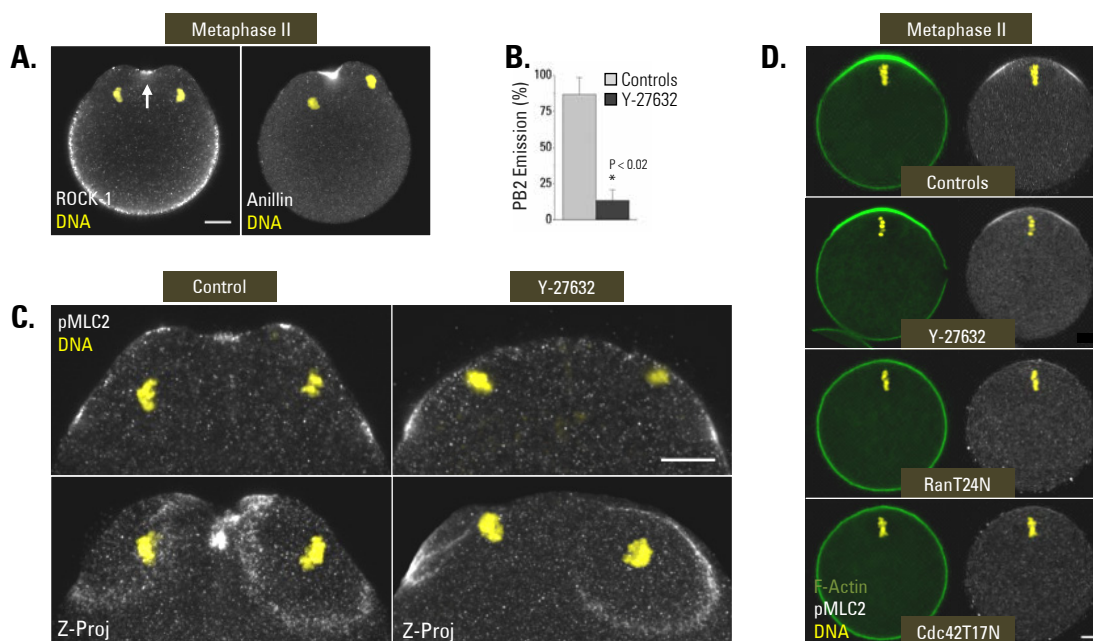


Figure 4 : Régulation différentielle des deux sous-populations de myosine 2 corticale.

Les ovocytes sont activés à l'éthanol 7%-8min (sauf MII). Pour les marquages ROCK-1 et anillin, les ovocytes sont fixés par 10% de TCA, et incubés en présence d'anticorps dirigés contre ces protéines (en blanc). Pour les marquages actine et myosine 2, les ovocytes sont fixés par 3,5% de PFA et incubés en présence de phalloïdine couplée à l'Alexa Fluor® (F-Actin en vert) et d'un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée (Ser19) de la chaîne légère de la myosine 2 (pMLC2 en blanc) (CellSignaling® 3671). Sur l'ensemble des marquages, l'ADN (en jaune) est révélé par le TO-PRO®-3. Les images ont été acquises par microscopie confocale sur une épaisseur en Z de 1µm, sauf pour les images mentionnées (Z-proj) où une projection en Z de 40 plans confocaux a été réalisée (intervalle de 1µm). Barre d'échelle = 10µm. **A.** Ovocyte MII ROCK-1 : localisation de ROCK-1 sur toute la périphérie de l'ovocyte à l'exception du cortex surplombant les chromatides. ROCK-1 se localise également dans la région d'ingression centrale du cortex (flèche blanche). Ovocyte MII Aniline : accumulation dans la région d'ingression centrale du cortex. **B.** Influence de l'inhibition de ROCK par le Y-27632 (50µM, post-activation) sur le taux d'émission du 2^{ème} GP 2h après l'activation : contrôles 87% n=66, Y-27632 11% n=99. Les barres d'erreurs représentent la variation standard de 3 expériences indépendantes. La différence statistique entre les ovocytes contrôles et les ovocytes traités a été évaluée par un test de Student. **C.** Effet du Y-27632 (50µM) sur la localisation de la myosine 2 corticale lors de l'anaphase II. Les ovocytes sont traités juste après l'activation et fixés à t= ~20min post-activation. Le Y-27632 inhibe seulement la sous-population de myosine 2 associée à l'ingression centrale du cortex. **D.** Effet du Y-27632 (50µM, temps d'incubation >2h) ou de la surexpression des formes dominantes-négatives des GTPases Ran (RANT24N) et Cdc42 (Cdc42T17N) sur la polarisation de l'acto-myosine corticale dans des ovocytes MII. Seules les inhibitions de Ran et Cdc42 permettent une délocalisation de l'acto-myosine corticale. L'ensemble de ces observations sont systématiques (n>30).

DISCUSSION

A. Cdc42-GTP : un rôle-clé dans la polarisation de l'ovocyte

Nos travaux ont montré que l'activation de la GTPase Cdc42 est essentielle à la polarisation de l'ovocyte de souris. L'utilisation d'une sonde spécifique (EGFP-wGBD) nous a permis de suivre la localisation de cette GTPase sous sa forme activée (Cdc42-GTP). Nos observations ont mis en évidence une parfaite similitude entre la dynamique de localisation de Cdc42-GTP et celle du dôme d'actine polarisé. Comme pour ce dernier, la localisation polarisée de Cdc42-GTP est dépendante de la chromatine et requiert la présence du gradient de Ran-GTP.

L'inhibition de Cdc42, par une forme-dominante négative (Cdc42T17N), nous a ensuite permis de démontrer le rôle indispensable de Cdc42-GTP dans la formation du dôme d'actine. Pour cela, Cdc42-GTP permet, via le recrutement de N-WASP, l'activation du complexe Arp2/3 nécessaire à la polymérisation des filaments du dôme (Sun SC et al, 2011 ; Yi K et al, 2011). Ainsi nous avons pu définir Cdc42 comme l'un des maillons de la cascade de signalisation permettant aux chromosomes d'induire, à distance, la polarisation du cortex ovocytaire. A ce titre, l'ovocyte de mammifère rejoint donc la longue liste des types cellulaires dont la polarité est régulée par cette GTPase.

Nos résultats montrent que cette cascade de signalisation (Ran/Cdc42/N-WASP/Arp2/3) est conservée lors de l'anaphase et est nécessaire à l'émission du 2^{ème} GP. Lors de l'anaphase II, l'inhibition de Cdc42-GTP empêche la formation des protrusions membranaires accompagnant normalement les deux lots de chromatides en cours de ségrégation. Cette observation suggère un rôle de protrusion pour les filaments d'actine composant les dômes polarisés. Cette propriété de l'actine a été observée dans de nombreuses circonstances, notamment dans cas du réseau, densément ramifié, nucléé par le complexe Arp2/3 (Condeelis J, 1993 ; Pollard TD and Borisy GG, 2003 ; Ridley AJ, 2011). A titre d'exemples, l'émission du GP semble donc faire appel à des mécanismes comparables à ceux de la formation du lamellipode des cellules migratrices, ou des invadopodes des cellules tumorales invasives (Condeelis J, 1993 ; Pollard TD and Borisy GG, 2003 ; Yamaguchi H et al, 2005 ; Ridley AJ, 2011).

Nos résultats partiels concernant l'inhibition de l'émission du 1^{er} globule polaire semble être, quant à eux, dus à une inhibition incomplète de Cdc42-GTP. En effet, une étude plus récente a démontré que la déplétion de Cdc42, obtenue par d'inactivation génétique (Cre/Lox), se traduit par une stérilité des femelles par faute d'émission du 1^{er} GP (Wang ZB et al, 2013). Leurs observations ont de plus corroborés nos conclusions en attribuant ce défaut d'émission à l'absence du dôme d'actine et d'une déficience dans la protrusion du GP. L'ensemble de ces résultats nous conforte à proposer le

modèle selon lequel l'activation de la cascade Cdc42/N-WASP/Arp2/3, en aval de Ran, permet de générer des filaments d'actine fortement ramifiés à l'origine de forces protrusives nécessaires à l'émission des GP.

Le mécanisme d'activation de Cdc42 dans l'ovocyte de souris est tout-à-fait original. En effet, nous avons pour la première fois décrit une activation corticale de Cdc42 en réponse d'un gradient de Ran-GTP porté par la chromatine. Dans l'ovocyte de *X.laevis*, où Cdc42 participe également à l'émission du 1^{er} GP, l'activation polarisée de la GTPase semble dépendre d'un mécanisme radicalement différent. Dans ce modèle l'apparition d'un dôme de Cdc42-GTP est conditionnée par l'interaction des microtubules émanant des pôles du fuseau avec le cortex ovocytaire (Ma C et al, 2006 ; Zhang et al, 2008). Au contraire, dans l'ovocyte de souris, nous avons montré que l'absence de microtubules n'altère en rien la propriété des chromosomes à induire l'activation de Cdc42. Il est donc intéressant de constater que divers mécanismes existent pour induire la protrusion des globules polaires dans des ovocytes de différentes espèces.

Dans l'ovocyte de souris, bien que le rôle de la chromatine et de Ran-GTP dans l'activation de Cdc42 ne semble faire aucun doute, le mécanisme exact par lequel cela se produit reste à déterminer. Comme nous l'avons vu précédemment, Ran sous sa forme activée (Ran-GTP) permet le relargage local de facteurs jusqu'alors séquestrés par les importines α et β (Caudron et al, 2005 ; Kalab and Heald, 2008). Cette caractéristique de la GTPase a été particulièrement étudiée lors de l'interphase où Ran joue un rôle-clé dans le transport nucléo-cytoplasmique des protéines. La sélection des facteurs séquestrés par les importines lors de ce processus, s'opère en fonction de la présence sur les protéines d'une séquence dite NLS (Nuclear Localisation Sequence) (Güttler T and Görlich D, 2011). On peut donc supposer que Ran-GTP, porté par les chromosomes, favorise l'accumulation à proximité du cortex polarisé d'un facteur capable d'induire l'activation de Cdc42. Soit de manière directe, si c'est un GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor), soit de manière indirecte en favorisant par exemple l'activation ou la stabilisation d'un GEF déjà polarisé. Pour restreindre les recherches, il serait donc intéressant d'examiner si, dans la grande famille des GEFs, certains possèdent une NLS, et sont donc susceptibles de se complexer aux importines.

B. Dépolarisation des phospho-ERMs, différents rôles envisagés

A l'image de nos travaux concernant la polarisation de l'actine corticale, nous avons pu mettre en évidence le rôle des chromosomes et de la signalisation Ran-GTP dans la dépolarisation des

phospho-ERMs. Ces protéines sont connues pour jouer un rôle majeur dans l'assemblage et le maintien des microvillosités membranaires (Yonemura et al, 1999 ; Fehon et al, 2010). A la surface des ovocytes les microvillosités servent de points d'ancrage pour le spermatozoïde (Wilson and Snell, 1998 ; Runge KE et al, 2007). On considère que la disparition des microvillosités au niveau du cortex surplombant le fuseau MII, a pour but d'éviter la fusion du spermatozoïde à cet endroit. En effet, le cas échéant, les chromatides paternels risqueraient de perturber l'organisation du fuseau et/ou de se retrouver expulsés dans le deuxième GP. L'exclusion ou l'inactivation des phospho-ERMs apparaît donc comme un mécanisme idéal pour le désassemblage des microvillosités (Yonemura et al, 1999 ; Fehon et al, 2010). Cependant, il est possible d'envisager d'autres rôles pour la dépolarisation des phospho-ERMs.

De par leur propriété à s'attacher simultanément à la membrane plasmique et aux filaments d'actine sous-jacents, les phospho-ERMs contribuent à ancrer la membrane au cytosquelette. Ils contribuent ainsi à la génération d'une tension corticale qui s'oppose à la déformation membranaire (Raucher D et Sheetz MP, 2000 ; Roubinet C et al, 2011 ; Kunda P et al, 2012). Nous pouvons donc supposer que l'exclusion des phospho-ERMs permet une relaxation locale du cortex nécessaire à la protrusion des GP. De plus, les filaments d'actine polarisée sont extrêmement dynamiques et génèrent un flux d'actine sous-membranaire. Comme nous l'avons vu précédemment, ce flux d'actine est lui-même à l'origine d'un flux cytoplasmique qui contribue à maintenir le positionnement asymétrique du fuseau méiotique (Yi K et al, 2011 ; Yi K et al, 2013). L'ancrage à la membrane des filaments d'actines semble donc incompatible avec ce type de processus dynamique. Ainsi, la dépolarisation localisée des phospho-ERMs pourrait également contribuer à « libérer » les filaments du dôme polarisé et faciliter ainsi le flux d'actine.

Afin de vérifier ces différentes hypothèses, Il serait intéressant de surexprimer dans l'ovocyte une forme constitutivement active (c'est-à-dire « ouverte ») d'ERM (par exemple, la radixine, ERM majoritaire dans l'ovocyte de souris ; Larson SM et al, 2010). Nous pourrions ainsi observer l'effet d'une telle surexpression sur la capacité de l'ovocyte à émettre des protrusions membranaires (GP), et à positionner son fuseau au moyen des flux cytoplasmiques. Ce type d'approche a déjà permis de fournir des résultats intéressants concernant la migration des lymphocytes T et la mitose cellulaire chez la drosophile (Brown MJ et al, 2003 ; Roubinet C et al, 2011 ; Kunda P et al, 2012 ; Liu Y et al, 2012). La découverte et l'inhibition du facteur responsable de la dépolarisation des phospho-ERM, agissant en aval de Ran-GTP, permettrait d'aborder ces questions avec plus de spécificité. Pour cela, et de la même manière que ce que nous proposons pour Cdc42, un ciblage des phosphatases possédant un NLS permettrait de restreindre les recherches. Nous ne pouvons cependant pas exclure la possibilité

d'une cause indirecte telle que le relargage d'un facteur permettant l'inhibition d'une kinase ou la saturation des sites de fixation des phospho-ERM dans le cortex polarisé.

De plus, et de manière intéressante, nos expériences ont révélées un découplage entre l'activation polarisée de Cdc42/Rac-1 et l'exclusion des phospho-ERMs. De ce fait, nous pouvons affirmer que la formation du dôme d'actine ne s'oppose pas à la phosphorylation des ERM ou à la fixation des phospho-ERMs. Cette observation suggère l'existence d'une voie de signalisation en aval de Ran-GTP agissant en parallèle de Cdc42. Cependant, aucune de nos expériences ne nous ont permis d'obtenir une perte de l'exclusion des phospho-ERMs avec un maintien du dôme d'actine polarisé (voir calyculin A et RanT24N, Dehapiot and Halet, 2013). Nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité d'une nécessité de la dépolarisation des phospho-ERMs pour la formation du dôme d'actine. Cette supposition peut s'appuyer sur la capacité des phospho-ERMs à favoriser l'activation de RhoA, B et C par la séquestration inactivatrice des RhoGDI (Rho Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor) (Takahashi K et al, 1997 ; Hamada K et al, 2001). En effet, les GTPases de type Rho sont connues pour agir de manière antagoniste à Cdc42 et Rac1 et s'opposer à leur activation (Sander EE et al, 1999 ; Etienne-Manneville and Hall, 2002 ; Vaughan et al, 2011). Selon cette hypothèse, l'exclusion de phospho-ERMs s'insérerait donc en amont de Cdc42 dans la cascade permettant aux chromosomes d'activer, via RanGTP, la polymérisation d'actine polarisée (voir schéma récapitulatif, fig. 4, Dehapiot and Halet, 2013). L'utilisation de dominants-négatifs ou d'inhibiteurs des GTPases de type Rho permettrait de vérifier cette hypothèse.

C. Régulation et rôles de l'acto-myosine lors de l'émission du 2^{ème} GP.

Lors de cette dernière étude, nous nous sommes intéressés au phénomène de rotation du fuseau précédant l'émission du 2^{ème} GP. Nos résultats nous ont permis d'en apprendre d'avantage sur ce processus qui constitue l'un des évènements de repositionnement du fuseau nécessaire à la division asymétrique de l'ovocyte de souris. Nous avons été en mesure de fournir une analyse systématique et quantitative de la dynamique de rotation, ainsi qu'une caractérisation inédite de la localisation de l'acto-myosine corticale suite au déclenchement de l'anaphase II.

Nous avons pu mettre en évidence l'existence au cortex de deux sous-populations de myosine 2 activée. La première, déjà présente en MII, est associée aux chromatides et se présente sous la forme d'anneaux entourant le (ou les) dôme(s) d'actine polarisés. La polarisation de cette sous-population de myosine 2 est connue pour être dépendante de la chromatine et de son gradient de Ran-

GTP associé (Deng et al, 2007). Nos travaux ont permis de démontrer que l'activation polarisée de Cdc42 est également nécessaire à la polarisation de ce type de myosine 2 lors de la MII. Ainsi, nous démontrons un nouveau rôle de Cdc42-GTP dans la polarisation du cortex ovocytaire. La deuxième sous-population de myosine 2 corticale, n'apparaît quant à elle que lors de l'anaphase II. Elle se localise au niveau de l'ingression centrale du cortex ovocytaire qui intervient entre les deux lots de chromatides en cours de ségrégation. Nous avons pu démontrer par l'inhibition de la voie Ect2/RhoA/ROCK, le rôle essentiel de cette deuxième sous-population dans l'ingression du cortex, la rotation du fuseau et l'émission du 2^{ème} GP. L'ensemble de ces observations, couplé à une co-localisation de l'anillin, nous indique que ce second type de myosine 2 appartient à l'anneau de cytodièrese du 2^{ème} GP et est responsable de sa contraction. Nous pouvons donc rejeter le modèle selon lequel la myosine 2 induite en MII par RanGTP/Cdc42GTP constitue un assemblage précoce de l'anneau de cytodièrese (Yi and Li, 2012). De ce fait, le rôle exact des anneaux de myosine 2 entourant le ou les dôme(s) d'actine polarisés demeure indéterminé.

Le phénomène de rétraction intervenant au niveau de la protrusion membranaire accompagnant le lot de chromatides internalisé, permet de proposer une première hypothèse quant à la fonction de ces anneaux lors de l'émission du 2^{ème} GP. En effet, la réorganisation de la myosine 2 en dôme lors de cette rétraction (voir Fig. 2C) nous rappelle l'effet du CK-666 (inhibiteur d'Arp2/3) sur des ovocytes MII. Dans ce contexte, l'inhibition d'Arp2/3 entraîne une relocalisation semblable de la myosine 2, qui se traduit par la contraction et la rétraction du cortex polarisé (Yi et al, 2011). Un tel rôle de la myosine 2 lors de la rétraction de la protrusion membranaire associée aux chromatides internalisées est donc tout à fait envisageable.

Les anneaux de myosine 2 peuvent également être considérés de manière plus globale comme nécessaires au processus d'attraction qu'exerce le cortex polarisé (actine + myosine 2) sur les chromosomes et/ou les pôles du fuseau (Yi et al, 2011 et 2013 ; Azoury et al, 2008 ; Schuh and Ellenberg, 2008). Des expériences préliminaires nous ayant permis de filmer des ovocytes activés exprimant Cdc42T17N, ont pu révéler l'importance du maintien de cette attraction lors de la deuxième division méiotique. En effet, sous l'effet de la contraction du cortex, propre à l'ingression de l'anneau de cytodièrese, nous avons observé une relocalisation centrale du fuseau dans les oocytes surexprimant CDC42T17N. Ainsi, la polarité de l'acto-myosine corticale joue peut-être un rôle dans le maintien du fuseau à proximité du cortex lors de l'anaphase II.

Les propriétés d'attraction du cortex semblent également pouvoir intervenir dans le processus de décision permettant l'orientation du fuseau lors de la rotation (gauche ou droite selon l'axe central).

En effet, lors des deux métaphases méiotiques, l'affinité du fuseau pour le cortex polarisé, semble participer à la brisure de symétrie permettant le positionnement asymétrique de ce dernier. Par analogie, nous pouvons donc supposer que les domaines polarisés du cortex, observés au-dessus de chacun des deux lots de chromatides en anaphase II, exercent des forces antagonistes ayant une influence sur l'orientation du fuseau. De manière très intéressante, les fuseaux d'ovocytes activés, dont la voie Ect2/RhoA/ROCK a été inhibée (Bi-2536 ou Y-27632), présentent dans la majorité des cas, une brisure de symétrie évidente dans leur orientation et ce en dépit d'une rotation non aboutie. Bien que des expériences complémentaires soient nécessaires pour valider ces observations, ce contexte fournit une opportunité intéressante pour tester l'influence de différents facteurs sur cette brisure de symétrie sans rotation.

Dans un premier temps, nous pourrions par exemple évaluer l'effet d'une dépolarisation de l'acto-myosine corticale sur ce phénomène, en faisant surexprimer CDC42T17N par les ovocytes traités. Nous pourrions également ajouter au milieu de culture, en plus du Y-27632, des inhibiteurs généralistes de la myosine 2 tels que la blebbistatine ou le ML-7. Ces deux inhibiteurs sont en effet connus pour empêcher la formation des anneaux de myosines 2 (Deng et al, 2004 et 2007), et seraient donc potentiellement très utiles pour déterminer leur fonction. Notre programme d'analyse d'image pourrait également nous permettre de quantifier, de manière systématique, différents paramètres. Nous pourrions par exemple mettre en relation l'orientation de la brisure de symétrie avec la distance respective au cortex, de chacun des deux lots de chromatides. Il est en effet fort probable, que ce facteur soit déterminant dans l'intensité de la polarisation et donc dans la force d'attraction des cortex polarisés.

Pour conclure, il serait très intéressant de découvrir quelle est la kinase ou le facteur en aval de Ran-GTP permettant l'activation de la myosine 2 des anneaux. Nous espérons que la mise en évidence du rôle de Cdc-42-GTP dans ce processus, puisse favoriser de manière décisive cette identification.

REFERENCES

- Adames NR, Cooper JA. Microtubule interactions with the cell cortex causing nuclear movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 2000 May 15;149(4):863-74
- Adams AE, Johnson DI, Longnecker RM, Sloat BF, Pringle JR. CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 1990 Jul;111(1):131-42
- Adhikari D, Liu K. mTOR signaling in the control of activation of primordial follicles. *Cell Cycle*. 2010 May;9(9):1673-4
- Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*. 001 May;121(5):647-53. Review
- Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)*
- Ashkenazi H, Cao X, Motola S, Popliker M, Conti M, Tsafirri A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology*. 2005 Jan;146(1):77-84
- Atwood SX, Prehoda KE. aPKC phosphorylates Miranda to polarize fate determinants during neuroblast asymmetric cell division. *Curr Biol*. 2009 May 12;19(9):723-9
- Atwood SX, Chabu C, Penkert RR, Doe CQ, Prehoda KE. Cdc42 acts downstream of Bazooka to regulate neuroblast polarity through Par-6 aPKC. *J Cell Sci*. 2007 Sep 15;120(Pt 18):3200-6
- Ayscough KR, Stryker J, Pokala N, Sanders M, Crews P, Drubin DG. High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J Cell Biol*. 1997 Apr 21;137(2):399-416
- Azoury J, Lee KW, Georget V, Rassinier P, Leader B, Verlhac MH. Spindle positioning in mouse oocytes relies on a dynamic meshwork of actin filaments. *Curr Biol*. 2008 Oct 14;18(19):1514-9
- Azoury J, Lee KW, Georget V, Hikal P, Verlhac MH. Symmetry breaking in mouse oocytes requires transient F-actin meshwork destabilization. *Development*. 2011 Jul;138(14):2903-8
- Balboula AZ, Schindler K. Selective disruption of aurora C kinase reveals distinct functions from aurora B kinase during meiosis in mouse oocytes. *PLoS Genet*. 2014 Feb 27;10(2):e1004194
- Belkina NV, Liu Y, Hao JJ, Karasuyama H, Shaw S. LOK is a major ERM kinase in resting lymphocytes and regulates cytoskeletal rearrangement through ERM phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 24;106(12):4707-12
- Bement WM, Benink HA, von Dassow G. A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification. *J Cell Biol*. 2005 Jul 4;170(1):91-101
- Bender A, Pringle JR. Use of a screen for synthetic lethal and multicopy suppressor mutants to identify two new genes involved in morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1991 Mar;11(3):1295-305
- Benink HA, Bement WM. Concentric zones of active RhoA and Cdc42 around single cell wounds. *J Cell Biol*. 2005 Jan 31;168(3):429-39
- Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova A, Varmuza S, Latham KE, Flaws JA, Salter JC, Hara H, Moskowitz MA, Li E, Greenberg A, Tilly JL, Yuan J. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev*. 1998 May 1;12(9):1304-14
- Betschinger J, Mechtler K, Knoblich JA. The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature*. 2003 Mar 20;422(6929):326-30
- Betschinger J, Eisenhaber F, Knoblich JA. Phosphorylation-induced autoinhibition regulates the cytoskeletal protein Lethal (2) giant larvae. *Curr Biol*. 2005 Feb 8;15(3):276-82
- Betschinger J, Mechtler K, Knoblich JA. Asymmetric segregation of the tumor suppressor brat regulates self-renewal in *Drosophila* neural stem cells. *Cell*. 2006 Mar 24;124(6):1241-53
- Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev*. 2014 Jan;94(1):235-63
- Blanchoin L, Pollard TD. Mechanism of interaction of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments. *J Biol Chem*. 1999 May 28;274(22):15538-46
- Bose I, Irazoqui JE, Moskow JJ, Bardes ES, Zyla TR, Lew DJ. Assembly of scaffold-mediated complexes containing Cdc42p, the exchange factor Cdc24p, and the effector Cla4p required for cell cycle-regulated phosphorylation of Cdc24p. *J Biol Chem*. 2001 Mar 9;276(10):7176-86
- Bowman SK, Neumüller RA, Novatchkova M, Du Q, Knoblich JA. The *Drosophila* NuMA Homolog Mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division. *Dev Cell*. 2006 Jun;10(6):731-42
- Boyd L, Guo S, Levitan D, Stinchcomb DT, Kemphues KJ. PAR-2 is asymmetrically distributed and promotes association of P granules and PAR-1 with the cortex in *C. elegans* embryos. *Development*. 1996 Oct;122(10):3075-84
- Brandman O, Ferrell JE Jr, Li R, Meyer T. Interlinked fast and slow positive feedback loops drive reliable cell decisions. *Science*. 2005 Oct 21;310(5747):496-8

- Brown MJ, Nijhara R, Hallam JA, Gignac M, Yamada KM, Erlandsen SL, Delon J, Kruhlak M, Shaw S. Chemokine stimulation of human peripheral blood T lymphocytes induces rapid dephosphorylation of ERM proteins, which facilitates loss of microvilli and polarization. *Blood*. 2003 Dec 1;102(12):3890-9
- Breuer M, Kolano A, Kwon M, Li CC, Tsai TF, Pellman D, Brunet S, Verlhac MH. HURP permits MTOC sorting for robust meiotic spindle bipolarity, similar to extra centrosome clustering in cancer cells. *J Cell Biol*. 2010 Dec 27;191(7):1251-60
- Bristol-Gould SK, Hutten CG, Sturgis C, Kilén SM, Mayo KE, Woodruff TK. The development of a mouse model of ovarian endosalpingiosis. *Endocrinology*. 2005 Dec;146(12):5228-36
- Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, Kilén SM, Cook RW, Kipp JL, Shea LD, Mayo KE, Woodruff TK. Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool. *Dev Biol*. 2006 Oct 1;298(1):132-48
- Brunet S, Maria AS, Guillaud P, Dujardin D, Kubiak JZ, Maro B. Kinetochore fibers are not involved in the formation of the first meiotic spindle in mouse oocytes, but control the exit from the first meiotic M phase. *J Cell Biol*. 1999 Jul 12;146(1):1-12
- Brunet S, Dumont J, Lee KW, Kinoshita K, Hikal P, Gruss OJ, Maro B, Verlhac MH. Meiotic regulation of TPX2 protein levels governs cell cycle progression in mouse oocytes. *PLoS One*. 2008 Oct 3;3(10):e3338
- Buckler HM, Healy DL, Burger HG. Purified FSH stimulates production of inhibin by the human ovary. *J Endocrinol*. 1989 Jul;122(1):279-85
- Burkel BM, von Dassow G, Bement WM. Versatile fluorescent probes for actin filaments based on the actin-binding domain of utrophin. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2007 Nov;64(11):822-32
- Butty AC, Perrinjaquet N, Petit A, Jaquenoud M, Segall JE, Hofmann K, Zwahlen C, Peter M. A positive feedback loop stabilizes the guanine-nucleotide exchange factor Cdc24 at sites of polarization. *EMBO J*. 2002 Apr 2;21(7):1565-76
- Cabernard C, Prehoda KE, Doe CQ. A spindle-independent cleavage furrow positioning pathway. *Nature*. 2010 Sep 2;467(7311):91-4
- Campellone KG, Welch MD. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Apr;11(4):237-51
- Canman JC, Lewellyn L, Laband K, Smerdon SJ, Desai A, Bowerman B, Oegema K. Inhibition of Rac by the GAP activity of centralspindlin is essential for cytokinesis. *Science*. 2008 Dec 5;322(5907):1543-6
- Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM, Albertini DF. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Dev Biol*. 1998 Dec 15;204(2):373-84
- Carabatsos MJ, Combelles CM, Messinger SM, Albertini DF. Sorting and reorganization of centrosomes during oocyte maturation in the mouse. *Microsc Res Tech*. 2000 Jun 1;49(5):435-44
- Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia GX, Hong Y, Chua NH, Pantaloni D. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol*. 1997 Mar 24;136(6):1307-22
- Carminati JL, Stearns T. Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *J Cell Biol*. 1997 Aug 11;138(3):629-41
- Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*. 2003 Jul 11;301(5630):215-8
- Caudron M, Bunt G, Bastiaens P, Karsenti E. Spatial coordination of spindle assembly by chromosome-mediated signaling gradients. *Science*. 2005 Aug 26;309(5739):1373-6
- Chaigne A, Campillo C, Gov NS, Voituriez R, Azoury J, Umaña-Díaz C, Almonacid M, Queguiner I, Nassoy P, Sykes C, Verlhac MH, Terret ME. A soft cortex is essential for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Nat Cell Biol*. 2013 Aug;15(8):958-66
- Chant J, Corrado K, Pringle JR, Herskowitz I. Yeast BUD5, encoding a putative GDP-GTP exchange factor, is necessary for bud site selection and interacts with bud formation gene BEM1. *Cell*. 1991 Jun 28;65(7):1213-24
- Charras GT, Hu CK, Coughlin M, Mitchison TJ. Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *J Cell Biol*. 2006 Nov 6;175(3):477-90
- Chenevert J, Corrado K, Bender A, Pringle J, Herskowitz I. A yeast gene (BEM1) necessary for cell polarization whose product contains two SH3 domains. *Nature*. 1992 Mar 5;356(6364):77-9
- Cherfils J, Zeghouf M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev*. 2013 Jan;93(1):269-309
- Chesarone MA, DuPage AG, Goode BL. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Jan;11(1):62-74
- Chiquoine AD. The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat Rec*. 1954 Feb;118(2):135-46
- Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJ. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*. 1996 Apr;137(4):1447-56
- Colombo K, Grill SW, Kimple RJ, Willard FS, Siderovski DP, Gönczy P. Translation of polarity cues into asymmetric spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Science*. 2003 Jun 20;300(5627):1957-61
- Condeelis JS. Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu Rev Cell Biol*. 1993;9:411-44. Review

- Connell M, Cabernard C, Ricketson D, Doe CQ, Prehoda KE. Asymmetric cortical extension shifts cleavage furrow position in *Drosophila* neuroblasts. *Mol Biol Cell*. 2011 Nov;22(22):4220-6
- Courtois A, Schuh M, Ellenberg J, Hiiragi T. The transition from meiotic to mitotic spindle assembly is gradual during early mammalian development. *J Cell Biol*. 2012 Aug 6;198(3):357-70
- Couwenbergs C, Labbé JC, Goulding M, Marty T, Bowerman B, Gotta M. Heterotrimeric G protein signaling functions with dynein to promote spindle positioning in *C. elegans*. *J Cell Biol*. 2007 Oct 8;179(1):15-22
- Cowan CR, Hyman AA. Centrosomes direct cell polarity independently of microtubule assembly in *C. elegans* embryos. *Nature*. 2004 Sep 2;431(7004):92-6
- Craig R, Smith R, Kendrick-Jones J. Light-chain phosphorylation controls the conformation of vertebrate non-muscle and smooth muscle myosin molecules. *Nature*. 1983 Mar 31-Apr 6;302(5907):436-9
- Cuenca AA, Schetter A, Aceto D, Kemphues K, Seydoux G. Polarization of the *C. elegans* zygote proceeds via distinct establishment and maintenance phases. *Development*. 2003 Apr;130(7):1255-65
- Cui XS, Li XY, Kim NH. Cdc42 is implicated in polarity during meiotic resumption and blastocyst formation in the mouse. *Mol Reprod Dev*. 2007 Jun;74(6):785-94
- Dahlgaard K, Raposo AA, Niccoli T, St Johnston D. Capu and Spire assemble a cytoplasmic actin mesh that maintains microtubule organization in the *Drosophila* oocyte. *Dev Cell*. 2007 Oct;13(4):539-53
- D'Avino PP, Glover DM. Cytokinesis: mind the GAP. *Nat Cell Biol*. 2009 Feb;11(2):112-4
- D'Avino PP, Savoian MS, Glover DM. Mutations in sticky lead to defective organization of the contractile ring during cytokinesis and are enhanced by Rho and suppressed by Rac. *J Cell Biol*. 2004 Jul 5;166(1):61-71
- Davydenko O, Schultz RM, Lampson MA. Increased CDK1 activity determines the timing of kinetochore-microtubule attachments in meiosis I. *J Cell Biol*. 2013 Jul 22;202(2):221-9
- Dehapiot B, Carrière V, Carroll J, Halet G. Polarized Cdc42 activation promotes polar body protrusion and asymmetric division in mouse oocytes. *Dev Biol*. 2013 May 1;377(1):202-12
- Dehapiot B, Halet G. Ran GTPase promotes oocyte polarization by regulating ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) inactivation. *Cell Cycle*. 2013 Jun 1;12(11):1672-8
- Deng M, Williams CJ, Schultz RM. Role of MAP kinase and myosin light chain kinase in chromosome-induced development of mouse egg polarity. *Dev Biol*. 2005 Feb 15;278(2):358-66
- Deng M, Suraneni P, Schultz RM, Li R. The Ran GTPase mediates chromatin signaling to control cortical polarity during polar body extrusion in mouse oocytes. *Dev Cell*. 2007 Feb;12(2):301-8
- Derivery E, Gautreau A. Generation of branched actin networks: assembly and regulation of the N-WASP and WAVE molecular machines. *Bioessays*. 2010 Feb;32(2):119-31
- Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Corsi P. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10;95(23):13612-7
- Doe CQ, Chu-LaGriff Q, Wright DM, Scott MP. The prospero gene specifies cell fates in the *Drosophila* central nervous system. *Cell*. 1991 May 3;65(3):451-64
- dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev*. 2003 Apr;83(2):433-73. Review
- Downs SM, Daniel SA, Bornslaeger EA, Hoppe PC, Eppig JJ. Maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes by purines: modulation of cAMP levels and cAMP phosphodiesterase activity. *Gamete Res*. 1989 Jul;23(3):323-34
- Duckworth BC, Weaver JS, Ruderman JV. G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 24;99(26):16794-9
- Dultz E, Zanin E, Wurzenberger C, Braun M, Rabut G, Sironi L, Ellenberg J. Systematic kinetic analysis of mitotic dis- and reassembly of the nuclear pore in living cells. *J Cell Biol*. 2008 Mar 10;180(5):857-65
- Dumont J, Petri S, Pellegrin F, Terret ME, Bohnsack MT, Rassinier P, Georget V, Kalab P, Gruss OJ, Verlhac MH. A centriole- and RanGTP-independent spindle assembly pathway in meiosis I of vertebrate oocytes. *J Cell Biol*. 2007 Jan 29;176(3):295-305
- Dumont J, Million K, Sunderland K, Rassinier P, Lim H, Leader B, Verlhac MH. Formin-2 is required for spindle migration and for the late steps of cytokinesis in mouse oocytes. *Dev Biol*. 2007 Jan 1;301(1):254-65
- Duncan FE, Moss SB, Schultz RM, Williams CJ. PAR-3 defines a central subdomain of the cortical actin cap in mouse eggs. *Dev Biol*. 2005 Apr 1;280(1):38-47
- Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development*. 2000 Oct;127(19):4277-91
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2001 Nov;142(11):4891-9
- Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev*. 2009 Oct;30(6):624-712. doi: 10.1210/er.2009-0012. Epub 2009 Sep 23. Review

- Eisenmann KM, Harris ES, Kitchen SM, Holman HA, Higgs HN, Alberts AS. Dia-interacting protein modulates formin-mediated actin assembly at the cell cortex. *Curr Biol*. 2007 Apr 3;17(7):579-91
- Elbaz J, Reizel Y, Nevo N, Galiani D, Dekel N. Epithelial cell transforming protein 2 (ECT2) depletion blocks polar body extrusion and generates mouse oocytes containing two metaphase II spindles. *Endocrinology*. 2010 Feb;151(2):755-65
- Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 2001 Dec;122(6):829-38. Review
- Eshel D, Urrestarazu LA, Vissers S, Jauniaux JC, van Vliet-Reedijk JC, Planta RJ, Gibbons IR. Cytoplasmic dynein is required for normal nuclear segregation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 1;90(23):11172-6
- Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002 Dec 12;420(6916):629-3
- Farkasovsky M, Küntzel H. Cortical Num1p interacts with the dynein intermediate chain Pac11p and cytoplasmic microtubules in budding yeast. *J Cell Biol*. 2001 Jan 22;152(2):251-62
- Faure S, Salazar-Fontana LI, Semichon M, Tybulewicz VL, Bismuth G, Trautmann A, Germain RN, Delon J. ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nat Immunol*. 2004 Mar;5(3):272-9
- Fededa JP, Gerlich DW. Molecular control of animal cell cytokinesis. *Nat Cell Biol*. 2012 May 2;14(5):440-7. doi: 10.1038/ncb2482. Review
- Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Apr;11(4):276-87. Review
- Fievet BT, Gautreau A, Roy C, Del Maestro L, Mangeat P, Louvard D, Arpin M. Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J Cell Biol*. 2004 Mar 1;164(5):653-9
- Finer JT, Simmons RM, Spudich JA. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*. 1994 Mar 10;368(6467):113-9
- Firat-Karalar EN, Welch MD. New mechanisms and functions of actin nucleation. *Curr Opin Cell Biol*. 2011 Feb;23(1):4-13
- FitzHarris G, Marangos P, Carroll J. Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. *Dev Biol*. 2007 May 1;305(1):133-44
- Foley EA, Kapoor TM. Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 Jan;14(1):25-37. doi: 10.1038/nrm3494. Review
- Gadea BB, Ruderman JV. Aurora kinase inhibitor ZM447439 blocks chromosome-induced spindle assembly, the completion of chromosome condensation, and the establishment of the spindle integrity checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Mol Biol Cell*. 2005 Mar;16(3):1305-18
- Gadea BB, Ruderman JV. Aurora B is required for mitotic chromatin-induced phosphorylation of Op18/Stathmin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 21;103(12):4493-8
- Gary R, Bretscher A. Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol Biol Cell*. 1995 Aug;6(8):1061-75
- Glotzer M. The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Jan;10(1):9-20
- Goehring NW, Trong PK, Bois JS, Chowdhury D, Nicola EM, Hyman AA, Grill SW. Polarization of PAR proteins by advective triggering of a pattern-forming system. *Science*. 2011 Nov 25;334(6059):1137-41
- Goldstein B, Macara IG. The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Dev Cell*. 2007 Nov;13(5):609-22. Review
- Goley ED, Welch MD. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Oct;7(10):713-26. Review
- Gotta M, Abraham MC, Ahringer J. CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in *C. elegans*. *Curr Biol*. 2001 Apr 3;11(7):482-8
- Gotta M, Dong Y, Peterson YK, Lanier SM, Ahringer J. Asymmetrically distributed *C. elegans* homologs of AGS3/PINS control spindle position in the early embryo. *Curr Biol*. 2003 Jun 17;13(12):1029-37
- Grava S, Schaerer F, Faty M, Philippsen P, Barral Y. Asymmetric recruitment of dynein to spindle poles and microtubules promotes proper spindle orientation in yeast. *Dev Cell*. 2006 Apr;10(4):425-39
- Grill SW, Hyman AA. Spindle positioning by cortical pulling forces. *Dev Cell*. 2005 Apr;8(4):461-5
- Grill SW, Gönczy P, Stelzer EH, Hyman AA. Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature*. 2001 Feb 1;409(6820):630-3
- Gruss OJ, Carazo-Salas RE, Schatz CA, Guarguaglini G, Kast J, Wilm M, Le Bot N, Vernos I, Karsenti E, Mattaj JW. Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell*. 2001 Jan 12;104(1):83-93
- Gueth-Hallonet C, Antony C, Aghion J, Santa-Maria A, Lajoie-Mazenc I, Wright M, Maro B. gamma-Tubulin is present in acenriolar MTOCs during early mouse development. *J Cell Sci*. 1993 May;105 (Pt 1):157-66
- Gulli MP, Jaquenoud M, Shimada Y, Niederhäuser G, Wiget P, Peter M. Phosphorylation of the Cdc42 exchange factor Cdc24 by the PAK-like kinase Cla4 may regulate polarized growth in yeast. *Mol Cell*. 2000 Nov;6(5):1155-67

- Guo S, Kemphues KJ. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*. 1995 May 19;81(4):611-20
- Güttinger S, Laurell E, Kutay U. Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Mar;10(3):178-91
- Güttler T, Görlich D. Ran-dependent nuclear export mediators: a structural perspective. *EMBO J*. 2011 Aug 31;30(17):3457-74. doi: 10.1038/emboj.2011.287. Review
- Hakem, A. et al. RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis. *Genes Dev*. 19, 1974–1979 (2005).
- Halet G, Carroll J. Rac activity is polarized and regulates meiotic spindle stability and anchoring in mammalian oocytes. *Dev Cell*. 2007 Feb;12(2):309-17
- Halpin D, Kalab P, Wang J, Weis K, Heald R. Mitotic spindle assembly around RCC1-coated beads in *Xenopus* egg extracts. *PLoS Biol*. 2011 Dec;9(12):e1001225
- Hamada K, Seto A, Shimizu T, Matsui T, Takai Y, Tsukita S, Tsukita S, Hakoshima T. Crystallization and preliminary crystallographic studies of RhoGDI in complex with the radixin FERM domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2001 Jun;57(Pt 6):889-90
- Han Y, Eppinger E, Schuster IG, Weigand LU, Liang X, Kremmer E, Peschel C, Krackhardt AM. Formin-like 1 (FMNL1) is regulated by N-terminal myristoylation and induces polarized membrane blebbing. *J Biol Chem*. 2009 Nov 27;284(48):33409-17
- Han SJ, Chen R, Paronetto MP, Conti M. Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse. *Curr Biol*. 2005 Sep 20;15(18):1670-6
- Handel MA, Schimenti JC. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet*. 2010 Feb;11(2):124-36s
- Heald R, McKeon F. Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell*. 1990 May 18;61(4):579-89
- Heald R, Tournebise R, Blank T, Sandaltzopoulos R, Becker P, Hyman A, Karsenti E. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature*. 1996 Aug 1;382(6590):420-5
- Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Sep;9(9):690-701. Review
- Heil-Chapdelaine RA, Tran NK, Cooper JA. Dynein-dependent movements of the mitotic spindle in *Saccharomyces cerevisiae* Do not require filamentous actin. *Mol Biol Cell*. 2000 Mar;11(3):863-72
- Helmke KJ, Heald R, Wilbur JD. Interplay between spindle architecture and function. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2013;306:83-125
- Higgs HN, Peterson KJ. Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. *Mol Biol Cell*. 2005 Jan;16(1):1-13
- Hinchcliffe EH, Thompson EA, Miller FJ, Yang J, Sluder G. Nucleo-cytoplasmic interactions that control nuclear envelope breakdown and entry into mitosis in the sea urchin zygote. *J Cell Sci*. 1999 Apr;112 (Pt 8):1139-48
- Hird SN, White JG. Cortical and cytoplasmic flow polarity in early embryonic cells of *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*. 1993 Jun;121(6):1343-55
- Hoege C, Constantinescu AT, Schwager A, Goehring NW, Kumar P, Hyman AA. LGL can partition the cortex of one-cell *Caenorhabditis elegans* embryos into two domains. *Curr Biol*. 2010 Jul 27;20(14):1296-303
- Holubcová Z, Howard G, Schuh M. Vesicles modulate an actin network for asymmetric spindle positioning. *Nat Cell Biol*. 2013 Aug;15(8):937-47
- Holt JE, Tran SM, Stewart JL, Minahan K, García-Higuera I, Moreno S, Jones KT. The APC/C activator FZR1 coordinates the timing of meiotic resumption during prophase I arrest in mammalian oocytes. *Development*. 2011 Mar;138(5):905-13
- Holt JE, Lane SI, Jones KT. The control of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Curr Top Dev Biol*. 2013;102:207-26
- Holy TE, Leibler S. Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jun 7;91(12):5682-5
- Huisman SM, Bales OA, Bertrand M, Smeets MF, Reed SI, Segal M. Differential contribution of Bud6p and Kar9p to microtubule capture and spindle orientation in *S. cerevisiae*. *J Cell Biol*. 2004 Oct 25;167(2):231-44. Epub 2004 Oct 18
- Hurov JB, Watkins JL, Piwnicka-Worms H. Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinases to regulate localization and activity. *Curr Biol*. 2004 Apr 20;14(8):736-4
- Hwang E, Kusch J, Barral Y, Huffaker TC. Spindle orientation in *Saccharomyces cerevisiae* depends on the transport of microtubule ends along polarized actin cables. *J Cell Biol*. 2003 May 12;161(3):483-8
- Ikebe M, Hartshorne DJ, Elzinga M. Identification, phosphorylation, and dephosphorylation of a second site for myosin light chain kinase on the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin. *J Biol Chem*. 1986 Jan 5;261(1):36-9
- Ikeshima-Kataoka H, Skeath JB, Nabeshima Y, Doe CQ, Matsuzaki F. Miranda directs Prospero to a daughter cell during *Drosophila* asymmetric divisions. *Nature*. 1997 Dec 11;390(6660):625-9
- Irazoqui JE, Gladfelter AS, Lew DJ. Scaffold-mediated symmetry breaking by Cdc42p. *Nat Cell Biol*. 2003 Dec;5(12):1062-70
- Irazoqui JE, Howell AS, Theesfeld CL, Lew DJ. Opposing roles for actin in Cdc42p polarization. *Mol Biol Cell*. 2005 Mar;16(3):1296-304

- Izumi Y, Ohta N, Hisata K, Raabe T, Matsuzaki F. Drosophila Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nat Cell Biol.* 2006 Jun;8(6):586-93
- Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature.* 1959 Jan 31;183(4657):302-3
- Jaffe AB, Kaji N, Durgan J, Hall A. Cdc42 controls spindle orientation to position the apical surface during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol.* 2008 Nov 17;183(4):625-33
- Jantsch-Plunger V, Gönczy P, Romano A, Schnabel H, Hamill D, Schnabel R, Hyman AA, Glotzer M. CYK-4: A Rho family gtpase activating protein (GAP) required for central spindle formation and cytokinesis. *J Cell Biol.* 2000 Jun 26;149(7):1391-404
- Jenkins N, Saam JR, Mango SE. CYK-4/GAP provides a localized cue to initiate anteroposterior polarity upon fertilization. *Science.* 2006 Sep 1;313(5791):1298-301
- Joberty G, Petersen C, Gao L, Macara IG. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol.* 2000 Aug;2(8):531-9
- Johnson MH, Eager D, Muggleton-Harris A, Grave HM. Mosaicism in organization concanavalin A receptors on surface membrane of mouse egg. *Nature.* 1975 Sep 25;257(5524):321-2
- Jordan SN, Canman JC. Rho GTPases in animal cell cytokinesis: an occupation by the one percent. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2012 Nov;69(11):919-30
- Joyce IM, Clark AT, Pendola FL, Eppig JJ. Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod.* 2000 Dec;63(6):1669-75
- Kalab P, Heald R. The RanGTP gradient - a GPS for the mitotic spindle. *J Cell Sci.* 2008 May 15;121(Pt 10):1577-86
- Kaltschmidt JA, Davidson CM, Brown NH, Brand AH. Rotation and asymmetry of the mitotic spindle direct asymmetric cell division in the developing central nervous system. *Nat Cell Biol.* 2000 Jan;2(1):7-12
- Karpova TS, Reck-Peterson SL, Elkind NB, Mooseker MS, Novick PJ, Cooper JA. Role of actin and Myo2p in polarized secretion and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 2000 May;11(5):1727-37
- Katsani KR, Karess RE, Dostatni N, Doye V. In vivo dynamics of Drosophila nuclear envelope components. *Mol Biol Cell.* 2008 Sep;19(9):3652-66
- Kawano, Y. et al. (1999) Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J. Cell Biol.* 147, 1023–1038
- Kemphues KJ, Priess JR, Morton DG, Cheng NS. Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell.* 1988 Feb 12;52(3):311-20
- Kim NH, Moon SJ, Prather RS, Day BN. Cytoskeletal alteration in aged porcine oocytes and parthenogenesis. *Mol Reprod Dev.* 1996 Apr;43(4):513-8
- Kirschner LS, Yin Z, Jones GN, Mahoney E. Mouse models of altered protein kinase A signaling. *Endocr Relat Cancer.* 2009 Sep;16(3):773-93. Review
- Kitajima TS, Ohsugi M, Ellenberg J. Complete kinetochore tracking reveals error-prone homologous chromosome biorientation in mammalian oocytes. *Cell.* 2011 Aug 19;146(4):568-81
- Knecht M, Catt KJ. Induction of luteinizing hormone receptors by adenosine 3',5'-monophosphate in cultured granulosa cells. *Endocrinology.* 1982 Oct;111(4):1192-200
- Knight PG, Glistler C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction.* 2001 Apr;121(4):503-12
- Kocer A, Reichmann J, Best D, Adams IR. Germ cell sex determination in mammals. *Mol Hum Reprod.* 2009 Apr;15(4):205-13
- Kolano A, Brunet S, Silk AD, Cleveland DW, Verlhac MH. Error-prone mammalian female meiosis from silencing the spindle assembly checkpoint without normal interkinetochore tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jul 3;109(27):E1858-67
- Kovacs, M., Wang, F., Hu, A., Zhang, Y. & Sellers, J. R. Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform. *J. Biol. Chem.* 278, 38132–38140 (2003).
- Kovar DR, Harris ES, Mahaffy R, Higgs HN, Pollard TD. Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell.* 2006 Jan 27;124(2):423-35
- Kozłowski C, Srayko M, Nedelec F. Cortical microtubule contacts position the spindle in *C. elegans* embryos. *Cell.* 2007 May 4;129(3):499-510
- Krahn MP, Klopfenstein DR, Fischer N, Wodarz A. Membrane targeting of Bazooka/Par-3 is mediated by direct binding to phosphoinositide lipids. *Curr Biol.* 2010 Apr 13;20(7):636-42
- Kraut R, Chia W, Jan LY, Jan YN, Knoblich JA. Role of inscuteable in orienting asymmetric cell divisions in Drosophila. *Nature.* 1996 Sep 5;383(6595):50-5
- Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec 22;95(26):15677-82
- Krek W, Nigg EA. Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *EMBO J.* 1991 Feb;10(2):305-16
- Krek W, Nigg EA. Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double

- block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates. *EMBO J.* 1991 Nov;10(11):3331-41
- Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet.* 1997 Feb;15(2):201-4
- Kunda P, Rodrigues NT, Moeendarbary E, Liu T, Ivetic A, Charras G, Baum B. PP1-mediated moesin dephosphorylation couples polar relaxation to mitotic exit. *Curr Biol.* 2012 Feb 7;22(3):231-6
- Kusch J, Meyer A, Snyder MP, Barral Y. Microtubule capture by the cleavage apparatus is required for proper spindle positioning in yeast. *Genes Dev.* 2002 Jul 1;16(13):1627-39
- Lammers, M., Meyer, S., Kuhlmann, D. and Wittinghofer, A. (2008). Specificity of interactions between mDia isoforms and Rho proteins. *J. Biol. Chem.* 283, 35236-35246.
- Larson SM, Lee HJ, Hung PH, Matthews LM, Robinson DN, Evans JP. Cortical mechanics and meiosis II completion in mammalian oocytes are mediated by myosin-II and Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) proteins. *Mol Biol Cell.* 2010 Sep 15;21(18):3182-92
- Le Clainche C, Carlier MF. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev.* 2008 Apr;88(2):489-513
- Leader B, Lim H, Carabatsos MJ, Harrington A, Ecsedy J, Pellman D, Maas R, Leder P. Formin-2, polyploidy, hypofertility and positioning of the meiotic spindle in mouse oocytes. *Nat Cell Biol.* 2002 Dec;4(12):921-8
- Leblanc J, Zhang X, McKee D, Wang ZB, Li R, Ma C, Sun QY, Liu XJ. The small GTPase Cdc42 promotes membrane protrusion during polar body emission via ARP2-nucleated actin polymerization. *Mol Hum Reprod.* 2011 May;17(5):305-16
- Ledan E, Polanski Z, Terret ME, Maro B. Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Dev Biol.* 2001 Apr 15;232(2):400-13
- Lee WL, Oberle JR, Cooper JA. The role of the lissencephaly protein Pac1 during nuclear migration in budding yeast. *J Cell Biol.* 2003 Feb 3;160(3):355-64
- Lee CY, Wilkinson BD, Siegrist SE, Wharton RP, Doe CQ. Brat is a Miranda cargo protein that promotes neuronal differentiation and inhibits neuroblast self-renewal. *Dev Cell.* 2006 Apr;10(4):441-9
- Lee CY, Andersen RO, Cabernard C, Manning L, Tran KD, Lanskey MJ, Bashirullah A, Doe CQ. *Drosophila* Aurora-A kinase inhibits neuroblast self-renewal by regulating aPKC/Numb cortical polarity and spindle orientation. *Genes Dev.* 2006 Dec 15;20(24):3464-74
- Lee CY, Robinson KJ, Doe CQ. Lgl, Pins and aPKC regulate neuroblast self-renewal versus differentiation. *Nature.* 2006 Feb 2;439(7076):594-8
- Lénárt P, Ellenberg J. Nuclear envelope dynamics in oocytes: from germinal vesicle breakdown to mitosis. *Curr Opin Cell Biol.* 2003 Feb;15(1):88-95. Review
- Lénárt P, Rabut G, Daigle N, Hand AR, Terasaki M, Ellenberg J. Nuclear envelope breakdown in starfish oocytes proceeds by partial NPC disassembly followed by a rapidly spreading fenestration of nuclear membranes. *J Cell Biol.* 2003 Mar 31;160(7):1055-68
- Levayer R, Lecuit T. Biomechanical regulation of contractility: spatial control and dynamics. *Trends Cell Biol.* 2012 Feb;22(2):61-81
- Li YY, Yeh E, Hays T, Bloom K. Disruption of mitotic spindle orientation in a yeast dynein mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Nov 1;90(21):10096-100
- Li L, Vaessin H. Pan-neural Prospero terminates cell proliferation during *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev.* 2000 Jan 15;14(2):147-51
- Li J, Kim H, Aceto DG, Hung J, Aono S, Kemphues KJ. Binding to PKC-3, but not to PAR-3 or to a conventional PDZ domain ligand, is required for PAR-6 function in *C. elegans*. *Dev Biol.* 2010 Apr 1;340(1):88-98
- Li H, Guo F, Rubinstein B, Li R. Actin-driven chromosomal motility leads to symmetry breaking in mammalian meiotic oocytes. *Nat Cell Biol.* 2008 Nov;10(11):1301-8
- Li R, Albertini DF. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 Mar;14(3):141-52
- Li R. The art of choreographing asymmetric cell division. *Dev Cell.* 2013 Jun 10;25(5):439-50. doi: 10.1016/j.devcel.2013.05.003. Review
- Liakopoulos D, Kusch J, Grava S, Vogel J, Barral Y. Asymmetric loading of Kar9 onto spindle poles and microtubules ensures proper spindle alignment. *Cell.* 2003 Feb 21;112(4):561-74
- Lin D, Edwards AS, Fawcett JP, Mbamalu G, Scott JD, Pawson T. A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol.* 2000 Aug;2(8):540-7
- Lincoln AJ, Wickramasinghe D, Stein P, Schultz RM, Palko ME, De Miguel MP, Tessarollo L, Donovan PJ. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat Genet.* 2002 Apr;30(4):446-9
- Liu, A. X., Rane, N., Liu, J. P. & Prendergast, G. C. RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6906–6912 (2001).
- Liu XJ. Polar body emission. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2012 Oct;69(10):670-85. doi: 10.1002/cm.21041. Epub 2012 Jun 21. Review
- Liu Y, Belkina NV, Park C, Nambiar R, Loughhead SM, Patino-Lopez G, Ben-Aissa K, Hao JJ, Kruhlak MJ, Qi H, von Andrian UH, Kehrl JH, Tyska MJ, Shaw S. Constitutively active ezrin increases

- membrane tension, slows migration, and impedes endothelial transmigration of lymphocytes in vivo in mice. *Blood*. 2012 Jan 12;119(2):445-53
- Longo FJ, Chen DY. Development of cortical polarity in mouse eggs: involvement of the meiotic apparatus. *Dev Biol*. 1985 Feb;107(2):382-94
- Lu B, Rothenberg M, Jan LY, Jan YN. Partner of Numb colocalizes with Numb during mitosis and directs Numb asymmetric localization in *Drosophila* neural and muscle progenitors. *Cell*. 1998 Oct 16;95(2):225-35
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 1;90(23):11162-6
- Ma C, Benink HA, Cheng D, Montplaisir V, Wang L, Xi Y, Zheng PP, Bement WM, Liu XJ. Cdc42 activation couples spindle positioning to first polar body formation in oocyte maturation. *Curr Biol*. 2006 Jan 24;16(2):214-20
- Macara IG, Mili S. Polarity and differential inheritance--universal attributes of life? *Cell*. 2008 Nov 28;135(5):801-12. doi: 10.1016/j.cell.2008.11.006. Review
- Mahajan RK, Pardee JD. Assembly mechanism of Dictyostelium myosin II: regulation by K⁺, Mg²⁺, and actin filaments. *Biochemistry*. 1996 Dec 3;35(48):15504-14
- Manandhar G, Schatten H, Sutovsky P. Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biol Reprod*. 2005 Jan;72(1):2-13. Review
- Marangos P, Carroll J. The dynamics of cyclin B1 distribution during meiosis I in mouse oocytes. *Reproduction*. 2004 Aug;128(2):153-62
- Maro B, Johnson MH, Webb M, Flach G. Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane. *J Embryol Exp Morphol*. 1986 Mar;92:11-32
- Masciarelli S, Horner K, Liu C, Park SH, Hinckley M, Hockman S, Nedachi T, Jin C, Conti M, Manganiello V. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *J Clin Invest*. 2004 Jul;114(2):196-205
- Matson S, Markoulaki S, Ducibella T. Antagonists of myosin light chain kinase and of myosin II inhibit specific events of egg activation in fertilized mouse eggs. *Biol Reprod*. 2006 Jan;74(1):169-76
- Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, Kaibuchi K, Tsukita S, Tsukita S. Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol*. 1998 Feb 9;140(3):647-57
- Matsumura F, Hartshorne DJ. Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Apr 25;369(1):149-56. Epub 2007 Dec 26. Review
- Matsumura F. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol*. 2005 Jul;15(7):371-7. Review
- Mayer M, Depken M, Bois JS, Jülicher F, Grill SW. Anisotropies in cortical tension reveal the physical basis of polarizing cortical flows. *Nature*. 2010 Sep 30;467(7315):617-21
- McCaffrey LM, Macara IG. Widely conserved signaling pathways in the establishment of cell polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Aug;1(2):a001370. Review
- McLachlan RI, Robertson DM, Healy DL, Burger HG, de Kretser DM. Circulating immunoreactive inhibin levels during the normal human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987 Nov;65(5):954-61
- McMullen ML, Cho BN, Yates CJ, Mayo KE. Gonadal pathologies in transgenic mice expressing the rat inhibin alpha-subunit. *Endocrinology*. 2001 Nov;142(11):5005-14
- Mehlmann LM, Jones TL, Jaffe LA. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science*. 2002 Aug 23;297(5585):1343-5
- Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evsikov AV, Pendola FL, Knowles BB, Eppig JJ, Jaffe LA. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science*. 2004 Dec 10;306(5703):1947-50
- Mehlmann LM. Oocyte-specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes. *Dev Biol*. 2005 Dec 15;288(2):397-404
- Mehlmann LM. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*. 2005 Dec;130(6):791-9. Review
- Merdes A, Ramyar K, Vechio JD, Cleveland DW. A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell*. 1996 Nov 1;87(3):447-58
- Miller RK, D'Silva S, Moore JK, Goodson HV. The CLIP-170 orthologue Bik1p and positioning the mitotic spindle in yeast. *Curr Top Dev Biol*. 2006;76:49-87. Review
- Mets DG, Meyer BJ. Condensins regulate meiotic DNA break distribution, thus crossover frequency, by controlling chromosome structure. *Cell*. 2009 Oct 2;139(1):73-86
- Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Schatten H. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Hum Reprod Update*. 2009 Sep-Oct;15(5):573-85
- Mitchison TJ, Kirschner MW. Properties of the kinetochore in vitro. I. Microtubule nucleation and tubulin binding. *J Cell Biol*. 1985 Sep;101(3):755-65

- Mitsushima M, Toyoshima F, Nishida E. Dual role of Cdc42 in spindle orientation control of adherent cells. *Mol Cell Biol.* 2009 May;29(10):2816-27.
- Molyneux KA, Stallock J, Schaible K, Wylie C. Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev Biol.* 2001 Dec 15;240(2):488-98
- Morone N, Fujiwara T, Murase K, Kasai RS, Ike H, Yuasa S, Usukura J, Kusumi A. Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J Cell Biol.* 2006 Sep 11;174(6):851-62
- Moseley JB, Goode BL. The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006 Sep;70(3):605-45. Review
- Motegi F, Zonies S, Hao Y, Cuenca AA, Griffin E, Seydoux G. Microtubules induce self-organization of polarized PAR domains in *Caenorhabditis elegans* zygotes. *Nat Cell Biol.* 2011 Oct 9;13(11):1361-7
- Munro E, Bowerman B. Cellular symmetry breaking during *Caenorhabditis elegans* development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Oct;1(4):a003400
- Munro E, Nance J, Priess JR. Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior-posterior polarity in the early *C. elegans* embryo. *Dev Cell.* 2004 Sep;7(3):413-24
- Murakami N, Chauhan VP, Elzinga M. Two nonmuscle myosin II heavy chain isoforms expressed in rabbit brains: filament forming properties, the effects of phosphorylation by protein kinase C and casein kinase II, and location of the phosphorylation sites. *Biochemistry.* 1998 Feb 17;37(7):1989-2003
- Na J, Zernicka-Goetz M. Asymmetric positioning and organization of the meiotic spindle of mouse oocytes requires CDC42 function. *Curr Biol.* 2006 Jun 20;16(12):1249-54
- Ng T, Parsons M, Hughes WE, Monypenny J, Zicha D, Gautreau A, Arpin M, Gschmeissner S, Verveer PJ, Bastiaens PI, Parker PJ. Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *EMBO J.* 2001 Jun 1;20(11):2723-41
- Nguyen-Ngoc T, Afshar K, Gönczy P. Coupling of cortical dynein and G alpha proteins mediates spindle positioning in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol.* 2007 Nov;9(11):1294-302
- Nijhara R, van Hennik PB, Gignac ML, Kruhlak MJ, Hordijk PL, Delon J, Shaw S. Rac1 mediates collapse of microvilli on chemokine-activated T lymphocytes. *J Immunol.* 2004 Oct 15;173(8):4985-93
- Nilsson EE, Skinner MK. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol.* 2004 Feb 12;214(1-2):19-25
- Nipper RW, Siller KH, Smith NR, Doe CQ, Prehoda KE. Galphai generates multiple Pins activation states to link cortical polarity and spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Sep 4;104(36):14306-11
- Nogueira D, Albano C, Adriaenssens T, Cortvrindt R, Bourgain C, Devroey P, Smitz J. Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor in vitro. *Biol Reprod.* 2003 Sep;69(3):1042-52
- Nolen BJ, Tomasevic N, Russell A, Pierce DW, Jia Z, McCormick CD, Hartman J, Sakowicz R, Pollard TD. Characterization of two classes of small molecule inhibitors of Arp2/3 complex. *Nature.* 2009 Aug 20;460(7258):1031-4
- Norbury C, Blow J, Nurse P. Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *EMBO J.* 1991 Nov;10(11):3321-9
- Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, Wang H, Ke H, Nikolaev VO, Jaffe LA. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development.* 2009 Jun;136(11):1869-78
- Oh JS, Han SJ, Conti M. Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *J Cell Biol.* 2010 Jan 25;188(2):199-207
- Ohi R, Sapra T, Howard J, Mitchison TJ. Differentiation of cytoplasmic and meiotic spindle assembly MCAK functions by Aurora B-dependent phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 2004 Jun;15(6):2895-906
- Ohtsubo M, Okazaki H, Nishimoto T. The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA. *J Cell Biol.* 1989 Oct;109(4 Pt 1):1389-97
- Okada I, Fujiki S, Iwase S, Abe H. Stabilization of actin filaments prevents germinal vesicle breakdown and affects microtubule organization in *Xenopus* oocytes. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2012 May;69(5):312-23
- Okada K, Bartolini F, Deaconescu AM, Moseley JB, Dogic Z, Grigorieff N, Gundersen GG, Goode BL. Adenomatous polyposis coli protein nucleates actin assembly and synergizes with the formin mDia1. *J Cell Biol.* 2010 Jun 28;189(7):1087-96
- Ookata K, Hisanaga S, Okano T, Tachibana K, Kishimoto T. Relocation and distinct subcellular localization of p34cdc2-cyclin B complex at meiosis reinitiation in starfish oocytes. *EMBO J.* 1992 May;11(5):1763-72
- Otomo T, Otomo C, Tomchick DR, Machius M, Rosen MK. Structural basis of Rho GTPase-mediated activation of the formin mDia1. *Mol Cell.* 2005 Apr 29;18(3):273-81
- Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem.* 2000 Dec 15;275(50):39523-8
- Otsuka F, Shimasaki S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 11;99(12):8060-5

- Pangas SA, Choi Y, Ballow DJ, Zhao Y, Westphal H, Matzuk MM, Rajkovic A. Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 23;103(21):8090-5
- Park DH, Rose LS. Dynamic localization of LIN-5 and GPR-1/2 to cortical force generation domains during spindle positioning. *Dev Biol*. 2008 Mar 1;315(1):42-54.
- Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*. 2004 Jan 30;303(5658):682-4
- Parrott JA, Skinner MK. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*. 1999 Sep;140(9):4262-71
- Pearson CG, Bloom K. Dynamic microtubules lead the way for spindle positioning. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Jun;5(6):481-92. Review
- Pepling ME, Spradling AC. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev Biol*. 2001 Jun 15;234(2):339-51
- Perez GI, Robles R, Knudson CM, Flaws JA, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nat Genet*. 1999 Feb;21(2):200-3
- Peters JM. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Sep;7(9):644-56. Epub 2006 Aug 9. Review
- Peter M, Nakagawa J, Dorée M, Labbé JC, Nigg EA. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell*. 1990 May 18;61(4):591-602
- Petronczki M, Glotzer M, Kraut N, Peters JM. Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle. *Dev Cell*. 2007 May;12(5):713-25
- Pfender S, Kuznetsov V, Pleiser S, Kerkhoff E, Schuh M. Spire-type actin nucleators cooperate with Formin-2 to drive asymmetric oocyte division. *Curr Biol*. 2011 Jun 7;21(11):955-60
- Piekny A, Werner M, Glotzer M. Cytokinesis: welcome to the Rho zone. *Trends Cell Biol*. 2005 Dec;15(12):651-8. Epub 2005 Oct 21. Review
- Piekny AJ, Glotzer M. Anillin is a scaffold protein that links RhoA, actin, and myosin during cytokinesis. *Curr Biol*. 2008 Jan 8;18(1):30-6
- Pirino G, Wescott MP, Donovan PJ. Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle*. 2009 Feb 15;8(4):665-70
- Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003 Feb 21;112(4):453-65. Review
- Pruyne D, Gao L, Bi E, Bretscher A. Stable and dynamic axes of polarity use distinct formin isoforms in budding yeast. *Mol Biol Cell*. 2004 Nov;15(11):4971-89
- Qualmann B, Kessels MM. New players in actin polymerization--WH2-domain-containing actin nucleators. *Trends Cell Biol*. 2009 Jun;19(6):276-85
- Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science*. 2004 Aug 20;305(5687):1157-9
- Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology*. 1995 Aug;136(8):3665-8
- Rauchner D, Sheetz MP. Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J Cell Biol*. 2000 Jan 10;148(1):127-6
- Reddy P, Shen L, Ren C, Boman K, Lundin E, Ottander U, Lindgren P, Liu YX, Sun QY, Liu K. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Dev Biol*. 2005 May 15;281(2):160-70
- Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hämäläinen T, Peng SL, Lan ZJ, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Liu K. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*. 2008 Feb 1;319(5863):611-3
- Reis, A., Chang, H.Y., Levasseur, M., Jones, K.T., 2006. APC^{cdh1} activity in mouse oocytes prevents entry into the first meiotic division. *Nat. Cell. Biol.* 8, 539–540
- Ridley AJ. Life at the leading edge. *Cell*. 2011 Jun 24;145(7):1012-22
- Robinson JW, Zhang M, Shuhaibar LC, Norris RP, Geerts A, Wunder F, Eppig JJ, Potter LR, Jaffe LA. Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. *Dev Biol*. 2012 Jun 15;366(2):308-16
- Robinson RC, Mejillano M, Le VP, Burtnick LD, Yin HL, Choe S. Domain movement in gelsolin: a calcium-activated switch. *Science*. 1999 Dec 3;286(5446):1939-42
- Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*. 1999 Apr 16;97(2):221-31
- Roh-Johnson M, Shemer G, Higgins CD, McClellan JH, Werts AD, Tulu US, Gao L, Betzig E, Kiehart DP, Goldstein B. Triggering a cell shape change by exploiting preexisting actomyosin contractions. *Science*. 2012 Mar 9;335(6073):1232-5

- Rolls MM, Albertson R, Shih HP, Lee CY, Doe CQ. *Drosophila* aPKC regulates cell polarity and cell proliferation in neuroblasts and epithelia. *J Cell Biol.* 2003 Dec 8;163(5):1089-98
- Romero S, Le Clainche C, Didry D, Egile C, Pantaloni D, Carlier MF. Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell.* 2004 Oct 29;119(3):419-29
- Rose L, Gönczy P. Polarity establishment, asymmetric division and segregation of fate determinants in early *C. elegans* embryos. *WormBook.* 2014 Dec 30:1-43
- Rose R, Weyand M, Lammers M, Ishizaki T, Ahmadian MR, Wittinghofer A. Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature.* 2005 May 26;435(7041):513-8
- Roubinet C, Decelle B, Chicanne G, Dorn JF, Payrastra B, Payre F, Carreno S. Molecular networks linked by Moesin drive remodeling of the cell cortex during mitosis. *J Cell Biol.* 2011 Oct 3;195(1):99-112
- Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Oct;8(10):798-812. Review
- Rucker EB 3rd, Dierisseau P, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Flaws JA, Hennighausen L. Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Mol Endocrinol.* 2000 Jul;14(7):1038-52
- Runge KE, Evans JE, He ZY, Gupta S, McDonald KL, Stahlberg H, Primakoff P, Myles DG. Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Dev Biol.* 2007 Apr 1;304(1):317-25
- Saito S, Liu XF, Kamijo K, Raziuddin R, Tatsumoto T, Okamoto I, Chen X, Lee CC, Lorenzi MV, Ohara N, Miki T. Deregulation and mislocalization of the cytokinesis regulator ECT2 activate the Rho signaling pathways leading to malignant transformation. *J Biol Chem.* 2004 Feb 20;279(8):7169-79
- Salbreux G, Charras G, Paluch E. Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis. *Trends Cell Biol.* 2012 Oct;22(10):536-45. review
- Sampath SC, Ohi R, Leismann O, Salic A, Pozniakovski A, Funabiki H. The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell.* 2004 Jul 23;118(2):187-202
- Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Collard JG. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol.* 1999 Nov 29;147(5):1009-22
- Schatz CA, Santarella R, Hoenger A, Karsenti E, Mattaj JW, Gruss OJ, Carazo-Salas RE. Importin alpha-regulated nucleation of microtubules by TPX2. *EMBO J.* 2003 May 1;22(9):2060-70
- Schuh M, Ellenberg J. Self-organization of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes. *Cell.* 2007 Aug 10;130(3):484-98
- Schuh M, Ellenberg J. A new model for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Curr Biol.* 2008 Dec 23;18(24):1986-92
- Schuh M. An actin-dependent mechanism for long-range vesicle transport. *Nat Cell Biol.* 2011 Oct 9;13(12):1431-6
- Schweisguth F. Regulation of notch signaling activity. *Curr Biol.* 2004 Feb;14(3):R129-38. Review
- Sebastian B, Kakizuka A, Hunter T. Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 15;90(8):3521-4
- Segaloff DL, Limbird LE. Luteinizing hormone receptor appearance in cultured porcine granulosa cells requires continual presence of follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Sep;80(18):5631-5
- Sela-Abramovich S, Edry I, Galiani D, Nevo N, Dekel N. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology.* 2006 May;147(5):2280-6
- Sept D, Xu J, Pollard TD, McCammon JA. Annealing accounts for the length of actin filaments formed by spontaneous polymerization. *Biophys J.* 1999 Dec;77(6):2911-9
- Shao H, Ma C, Zhang X, Li R, Miller AL, Bement WM, Liu XJ. Aurora B regulates spindle bipolarity in meiosis in vertebrate oocytes. *Cell Cycle.* 2012 Jul 15;11(14):2672-80
- Sheeman B, Carvalho P, Sagot I, Geiser J, Kho D, Hoyt MA, Pellman D. Determinants of *S. cerevisiae* dynein localization and activation: implications for the mechanism of spindle positioning. *Curr Biol.* 2003 Mar 4;13(5):364-72
- Shen CP, Jan LY, Jan YN. Miranda is required for the asymmetric localization of Prospero during mitosis in *Drosophila*. *Cell.* 1997 Aug 8;90(3):449-58
- Shuda K, Schindler K, Ma J, Schultz RM, Donovan PJ. Aurora kinase B modulates chromosome alignment in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2009 Nov;76(11):1094-105
- Siegrist SE, Doe CQ. Microtubule-induced Pins/Galpai cortical polarity in *Drosophila* neuroblasts. *Cell.* 2005 Dec 29;123(7):1323-35
- Siegrist SE, Doe CQ. Extrinsic cues orient the cell division axis in *Drosophila* embryonic neuroblasts. *Development.* 2006 Feb;133(3):529-36
- Siller KH, Cabernard C, Doe CQ. The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Nat Cell Biol.* 2006 Jun;8(6):594-600
- Siller KH, Doe CQ. Lis1/dynactin regulates metaphase spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Dev Biol.* 2008 Jul 1;319(1):1-9

- Siller KH, Doe CQ. Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol.* 2009 Apr;11(4):365-74. Review
- Silljé HH, Nagel S, Körner R, Nigg EA. HURP is a Ran-importin beta-regulated protein that stabilizes kinetochore microtubules in the vicinity of chromosomes. *Curr Biol.* 2006 Apr 18;16(8):731-42
- Simerly C, Nowak G, de Lanerolle P, Schatten G. Differential expression and functions of cortical myosin IIA and IIB isoforms during meiotic maturation, fertilization, and mitosis in mouse oocytes and embryos. *Mol Biol Cell.* 1998 Sep;9(9):2509-25
- Sit ST, Manser E. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 2011 Mar 1;124(Pt 5):679-83. Review
- Sjoblom B, Salmazo A, Djinovic-Carugo K. Alpha-actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Sep;65(17):2688-701
- Skau CT, Courson DS, Bestul AJ, Winkelman JD, Rock RS, Sirotkin V, Kovar DR. Actin filament bundling by fimbrin is important for endocytosis, cytokinesis, and polarization in fission yeast. *J Biol Chem.* 2011 Jul 29;286(30):26964-77
- Slaughter BD, Smith SE, Li R. Symmetry breaking in the life cycle of the budding yeast. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Sep;1(3):a003384. Review
- Smith CA, Lau KM, Rahmani Z, Dho SE, Brothers G, She YM, Berry DM, Bonnell E, Thibault P, Schweisguth F, Le Borgne R, McGlade CJ. aPKC-mediated phosphorylation regulates asymmetric membrane localization of the cell fate determinant Numb. *EMBO J.* 2007 Jan 24;26(2):468-80
- Song L, Rape M. Regulated degradation of spindle assembly factors by the anaphase-promoting complex. *Mol Cell.* 2010 May 14;38(3):369-82
- Soyal SM, Amleh A, Dean J. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development.* 2000 Nov;127(21):4645-54
- Spiering D, Hodgson L. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh Migr.* 2011 Mar-Apr;5(2):170-80. Review
- Srinivasan DG, Fisk RM, Xu H, van den Heuvel S. A complex of LIN-5 and GPR proteins regulates G protein signaling and spindle function in *C. elegans*. *Genes Dev.* 2003 May 15;17(10):1225-39
- Stewart MP, Helenius J, Toyoda Y, Ramanathan SP, Muller DJ, Hyman AA. Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding. *Nature.* 2011 Jan 13;469(7329):226-30
- Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, Shapiro SS. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Feb;2(2):138-45. Review
- Su YQ, Sugiura K, Eppig JJ. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Semin Reprod Med.* 2009 Jan;27(1):32-42. doi: 10.1055/s-0028-1108008
- Sun SC, Wang ZB, Xu YN, Lee SE, Cui XS, Kim NH. Arp2/3 complex regulates asymmetric division and cytokinesis in mouse oocytes. *PLoS One.* 2011 Apr 8;6(4):e18392
- Sun SC, Xu YN, Li YH, Lee SE, Jin YX, Cui XS, Kim NH. WAVE2 regulates meiotic spindle stability, peripheral positioning and polar body emission in mouse oocytes. *Cell Cycle.* 2011 Jun 1;10(11):1853-60
- Sun SC, Sun QY, Kim NH. JMY is required for asymmetric division and cytokinesis in mouse oocytes. *Mol Hum Reprod.* 2011 May;17(5):296-304
- Swain JE, Ding J, Wu J, Smith GD. Regulation of spindle and chromatin dynamics during early and late stages of oocyte maturation by aurora kinases. *Mol Hum Reprod.* 2008 May;14(5):291-9
- Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A, Takaishi K, Kameyama T, Tsukita S, Takai Y. Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem.* 1997 Sep 12;272(37):23371-5
- Tam PP, Zhou SX. The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Dev Biol.* 1996 Aug 25;178(1):124-32
- Tanaka SS, Yamaguchi YL, Tsoi B, Lickert H, Tam PP. IFITM/Mil/fragilis family proteins IFITM1 and IFITM3 play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion. *Dev Cell.* 2005 Dec;9(6):745-56
- Tanaka TU. Kinetochore-microtubule interactions: steps towards bi-orientation. *EMBO J.* 2010 Dec 15;29(24):4070-82
- Terada Y, Simerly C, Schatten G. Microfilament stabilization by jasplakinolide arrests oocyte maturation, cortical granule exocytosis, sperm incorporation cone resorption, and cell-cycle progression, but not DNA replication, during fertilization in mice. *Mol Reprod Dev.* 2000 May;56(1):89-98
- Terasaki M, Campagnola P, Rolls MM, Stein PA, Ellenberg J, Hinkle B, Slepchenko B. A new model for nuclear envelope breakdown. *Mol Biol Cell.* 2001 Feb;12(2):503-10
- Thompson BJ. Cell polarity: models and mechanisms from yeast, worms and flies. *Development.* 2013 Jan 1;140(1):13-21
- Tsou MF, Hayashi A, DeBella LR, McGrath G, Rose LS. LET-99 determines spindle position and is asymmetrically enriched in response to PAR polarity cues in *C. elegans* embryos. *Development.* 2002 Oct;129(19):4469-81
- Tsou MF, Hayashi A, Rose LS. LET-99 opposes Galpha/GPR signaling to generate asymmetry for spindle positioning in response to PAR and MES-1/SRC-1 signaling. *Development.* 2003 Dec;130(23):5717-30
- Tybulewicz VL, Henderson RB. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* 2009 Sep;9(9):630-44. Review

- Vaccari S, Horner K, Mehlmann LM, Conti M. Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. *Dev Biol*. 2008 Apr 1;316(1):124-34
- Vaccari S, Weeks JL 2nd, Hsieh M, Menniti FS, Conti M. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod*. 2009 Sep;81(3):595-604
- Van Blerkom J, Bell H. Regulation of development in the fully grown mouse oocyte: chromosome-mediated temporal and spatial differentiation of the cytoplasm and plasma membrane. *J Embryol Exp Morphol*. 1986 Apr;93:213-38
- Vaughan EM, Miller AL, Yu HY, Bement WM. Control of local Rho GTPase crosstalk by Abr. *Curr Biol*. 2011 Feb 22;21(4):270-7
- Verlhac MH, Lefebvre C, Guillaud P, Rassinier P, Maro B. Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Curr Biol*. 2000 Oct 19;10(20):1303-6
- Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Nov;10(11):778-90
- Vignjevic D, Peloquin J, Borisy GG. In vitro assembly of filopodia-like bundles. *Methods Enzymol*. 2006;406:727-39
- Vinot S, Le T, Maro B, Louvet-Vallée S. Two PAR6 proteins become asymmetrically localized during establishment of polarity in mouse oocytes. *Curr Biol*. 2004 Mar 23;14(6):520-5
- Wang, F. et al. Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance. *J. Biol. Chem*. 278, 27439–27448 (2003).
- Wang H, Somers GW, Bashirullah A, Heberlein U, Yu F, Chia W. Aurora-A acts as a tumor suppressor and regulates self-renewal of *Drosophila* neuroblasts. *Genes Dev*. 2006 Dec 15;20(24):3453-63
- Wang Q, Racowsky C, Deng M. Mechanism of the chromosome-induced polar body extrusion in mouse eggs. *Cell Div*. 2011 Aug 25;6:17
- Wang ZB, Jiang ZZ, Zhang QH, Hu MW, Huang L, Ou XH, Guo L, Ouyang YC, Hou Y, Brakebusch C, Schatten H, Sun QY. Specific deletion of Cdc42 does not affect meiotic spindle organization/migration and homologous chromosome segregation but disrupts polarity establishment and cytokinesis in mouse oocytes. *Mol Biol Cell*. 2013 Dec;24(24):3832-41
- Wassarman PM, Litscher ES. Biogenesis of the mouse egg's extracellular coat, the zona pellucida. *Curr Top Dev Biol*. 2013;102:243-66
- Webb M, Howlett SK, Maro B. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in ageing mouse eggs. *J Embryol Exp Morphol*. 1986 Jun;95:131-45
- Wedlich-Soldner R, Altschuler S, Wu L, Li R. Spontaneous cell polarization through actomyosin-based delivery of the Cdc42 GTPase. *Science*. 2003 Feb 21;299(5610):1231-5
- Wedlich-Soldner R, Wai SC, Schmidt T, Li R. Robust cell polarity is a dynamic state established by coupling transport and GTPase signaling. *J Cell Biol*. 2004 Sep 13;166(6):889-900
- Wilson NF, Snell WJ. Microvilli and cell-cell fusion during fertilization. *Trends Cell Biol*. 1998 Mar;8(3):93-6. Review
- Wodarz A, Ramrath A, Kuchinke U, Knust E. Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature*. 1999 Dec 2;402(6761):544-7
- Wu H, Feng W, Chen J, Chan LN, Huang S, Zhang M. PDZ domains of Par-3 as potential phosphoinositide signaling integrators. *Mol Cell*. 2007 Dec 14;28(5):886-98
- Yamaguchi H, Lorenz M, Kempiak S, Sarmiento C, Coniglio S, Symons M, Segall JE, Eddy RJ, Miki H, Takenawa T, Condeelis JS. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol*. 2005 Jan 31;168(3):441-52
- Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol*. 2001 Jun;15(6):854-66
- Yasuda S, Ocegueda-Yanez F, Kato T, Okamoto M, Yonemura S, Terada Y, Ishizaki T, Narumiya S. Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores. *Nature*. 2004 Apr 15;428(6984):767-71
- Yasuda S, Taniguchi H, Ocegueda-Yanez F, Ando Y, Watanabe S, Monypenny J, Narumiya S. An essential role of Cdc42-like GTPases in mitosis of HeLa cells. *FEBS Lett*. 2006 Jun 12;580(14):3375-80
- Yi K, Unruh JR, Deng M, Slaughter BD, Rubinstein B, Li R. Dynamic maintenance of asymmetric meiotic spindle position through Arp2/3-complex-driven cytoplasmic streaming in mouse oocytes. *Nat Cell Biol*. 2011 Aug 28;13(10):1252-8
- Yi K, Li R. Actin cytoskeleton in cell polarity and asymmetric division during mouse oocyte maturation. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2012 Oct;69(10):727-37
- Yi K, Rubinstein B, Unruh JR, Guo F, Slaughter BD, Li R. Sequential actin-based pushing forces drive meiosis I chromosome migration and symmetry breaking in oocytes. *J Cell Biol*. 2013 Mar 4;200(5):567-76
- Yonemura S, Hirao M, Doi Y, Takahashi N, Kondo T, Tsukita S, Tsukita S. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol*. 1998 Feb 23;140(4):885-95

- Yonemura S, Matsui T, Tsukita S, Tsukita S. Rho-dependent and – independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo. *J Cell Sci.* 2002 Jun 15;115(Pt 12):2569-80
- Yoshizaki H, Ohba Y, Kurokawa K, Itoh RE, Nakamura T, Mochizuki N, Nagashima K, Matsuda M. Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J Cell Biol.* 2003 Jul 21;162(2):223-32
- Yoshizaki H, Ohba Y, Parrini MC, Dulyaninova NG, Bresnick AR, Mochizuki N, Matsuda M. Cell type-specific regulation of RhoA activity during cytokinesis. *J Biol Chem.* 2004 Oct 22;279(43):44756-62
- Yuce, O. et al. (2005) An ECT2–centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *J. Cell Biol.* 170, 571–582 9
- Severson, A.F. et al.
- Zhang X, Ma C, Miller AL, Katbi HA, Bement WM, Liu XJ. Polar body emission requires a RhoA contractile ring and Cdc42-mediated membrane protrusion. *Dev Cell.* 2008 Sep;15(3):386-400
- Zhong ZS, Huo LJ, Liang CG, Chen DY, Sun QY. Small GTPase RhoA is required for ooplasmic segregation and spindle rotation, but not for spindle organization and chromosome separation during mouse oocyte maturation, fertilization, and early cleavage. *Mol Reprod Dev.* 2005 Jun;71(2):256-61
- Zhou J, Kumar TR, Matzuk MM, Bondy C. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol Endocrinol.* 1997 Dec;11(13):1924-33
- Zhu ZY, Chen DY, Li JS, Lian L, Lei L, Han ZM, Sun QY. Rotation of meiotic spindle is controlled by microfilaments in mouse oocytes. *Biol Reprod.* 2003 Mar;68(3):943-6
- Zuccotti M, Garagna S, Merico V, Monti M, Alberto Redi C. Chromatin organisation and nuclear architecture in growing mouse oocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2005 Apr 29;234(1-2):11-7. Review
- Zuchero JB, Coutts AS, Quinlan ME, Thangue NB, Mullins RD. p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nat Cell Biol.* 2009 Apr;11(4):451-9